SOCIETÀ ITALIANA
DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA

XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Parma

Centro Congressi
Comune di Parma

30 Settembre - 2 Ottobre 2009

VOLUME DEGLI ATTI

Consiglio Direttivo S.I.Di.L.V.

Gian Luca Autorino, *Presidente*
Maria Caramelli, *Vice Presidente*
Alfredo Caprioli, *Segretario*
Antonio Fasanella, *Tesoriere*
Monica Cagiola, *Membro*
Sergio Rosati, *Membro*
Alessandra Stancanelli, *Membro*
Santo Caracappa, *Past President*
Guido Leori, *Revisore dei conti*
Mario Luini, *Revisore dei conti*
Stefano Reale, *Revisore dei conti*

Comitato Scientifico

Emiliana Brocchi, *Brescia*
Sandro Cavirani, *Parma*
Paolo Cordioli, *Brescia*
Attilio Corradi, *Parma*
Antonio Ubaldi, *Parma*
Il Consiglio Direttivo S.I.Di.L.V.

Comitato Organizzativo

Giuseppe Barigazzi, *Parma*
Sandro Cavirani, *Parma*
Stefano Cinotti, *Brescia*
Attilio Corradi, *Parma*
Antonio Ubaldi, *Parma*

Segreteria Ecm

Luisa Garau, *Brescia*
Gianfranco Spalenza, *Brescia*
Tel. +39 030 2290230

www.sidilv.org

Segreteria Organizzativa

New TEAM
EVENTI DI COMUNICAZIONE

Via C. Ghiretti, 2 - 43100 Parma
Tel. 0521 293913
Fax 0521 294036
e-mail: giorgia.montanari@newteam.it
www.newteam.it/SIDILV2009

Lettera del Presidente

Cari Colleghi,

Presento, con apprezzamento, questo volume degli atti dell' XI° Congresso S.I.Di.L.V.. Quest'anno l'evento è stato organizzato con la collaborazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia Romagna e della Lombardia e della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma. Sottolineo con piacere la coincidenza che proprio colleghi di queste due istituzioni, oggi presenti nei Comitati Scientifico ed Organizzativo, fossero fra i firmatari, nel 1998, dell'atto costitutivo della nostra Associazione.
Anche in questa edizione i contributi scientifici sono numerosi, a testimoniare il consolidamento dell'interesse nei confronti degli eventi organizzati dalla nostra Società. Considerata la recente attivazione del sito web della Società (www.sidilv.org), il presente volume potrebbe essere l'ultimo edito a stampa. Certamente la disponibilità in rete dei lavori aumenterà la possibilità di accesso anche e soprattutto a ricercatori non iscritti, dando maggiore visibilità alla Società stessa. Per questo motivo, sarà quindi valutata l'opportunità di rendere obbligatoria la traduzione degli abstract e dei titoli delle comunicazioni in lingua inglese, per rendere maggiormente fruibili i risultati. Tutto ciò dovrà anche comportare un maggiore rigore nella selezione dei contributi.
La città di Parma oltre a possedere un patrimonio storico ed artistico unico per coloro che, non conoscendola, vorranno associare alla partecipazione al Congresso eventuali visite, possiede strutture di accoglienza adeguate per ospitare eventi culturali e manifestazioni scientifiche. In proposito, a nome del Consiglio Direttivo rivolgo un particolare ringraziamento al Comune della Città che ha messo a disposizione della S.I.Di.L.V. le strutture del Centro Congressi. La città è anche sede dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), materia oggi di preponderante attenzione per le attività delle strutture che operano nell'ambito della Sanità Pubblica e Sanità Veterinaria.
Anche quest'anno, grazie agli esperti che hanno accolto l'invito a partecipare, sarà possibile un confronto serrato con i ricercatori ed i partecipanti al congresso su tematiche classiche, non di meno sempre attuali, relative a problemi di sanità animale e zoonosi, a malattie emergenti a carattere epidemico, quali quelle trasmesse da vettori e l'influenza da virus A (H1N1), fino ad affrontare argomenti non squisitamente veterinari, ma per i quali gli Istituti Zooprofilattici devono maturare competenze, quali il rischio microbiologico e chimico legato al consumo di alimenti di origine vegetale.
Un sincero riconoscimento ed apprezzamento è rivolto al Comitato Organizzativo ed allo staff che ha collaborato alla realizzazione dell' XI° Congresso, al Comitato Scientifico per il lavoro svolto nello stilare il programma e nella valutazione dei contributi da presentare come comunicazioni orali.
Infine, un grazie agli esperti che hanno accettato di presentare le letture plenarie ed agli sponsor del settore che hanno aderito numerosi, contribuendo alla riuscita della manifestazione.

Gian Luca Autorino
Presidente S.I.Di.L.V.

Il Comitato Organizzativo dell' XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. è grato ai seguenti Enti ed Aziende per il fattivo contributo fornito alla realizzazione dell'evento:

Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria

dell'Università degli Studi di Parma

Comune di Parma

Provincia di Parma

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia

e dell'Emilia Romagna

BIO MERIEUX ITALIA

BIO-X DIAGNOSTICS

BIOTEST ITALIA

HAMILTON ITALIA

IDEXX LABORATORIES

ID VET

MEDICAL SERVICE 2000

MILTENYI BIOTECH

OR SELL

PROMEVET

QIAGEN

INDICE

LETTURE PLENARIE, COMUNICAZIONI ORALI

LE ROSE DI ULISSE: BIOLOGIA MOLECOLARE, ARCHEOLOGIA E LINGUISTICA PER COSTRUIRE UNA NUOVA IMMAGINE DELLA STORIA EUROPEA
Riccò M. pag . 3

MICROBIOLOGIC RISK ASSOCIATED WITH FRESH PRODUCE: THE INTERACTION BETWEEN FOODBORNE PATHOGENS AND VEGETABLES
Frankel G. pag . 9

LA TECNICA DEL MINI-MPN PER LA QUANTIFICAZIONE DI SALMONELLA IN MATRICI ALIMENTARI
Barco L., Lettini A., Mancin M., Antonello K., Marafin E., Ricci A. pag . 10

ISOLAMENTO E GENOTIPIZZAZIONE DI CAMPYLOBACTER JEJUNI DA INFEZIONI MAMMARIE DEL BOVINO
Benedetti V., Gorni C., Mariani P., Piccinini R., Vezzoli F., Luini M. pag . 12

RICERCA DI *ESCHERICHIA COLI* O157 IN CAMPIONI FECALI BOVINI: VALUTAZIONE COMPARATIVA DI UN METODO MICROBIOLOGICO TRADIZIONALE ED UNO IN PCR REAL TIME
Targhetta C., Noli A., Gagliazzo L., Conedera G. pag . 14

INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE DA *Listeria monocytogenes* E *Listeria spp*. IN UNO STABILIMENTO DI STAGIONATURA, DISOSSO E AFFETTATURA DI PROSCIUTTO CRUDO: CONFRONTO FRA METODICHE
Chiapponi C., Re M., Pierantoni M., Mazza G., Barigazzi G., Foni E. pag . 16

CONFRONTO DI AMPLIFIED FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM E MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING PER LA GENOTIPIZZAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* - *DATI PRELIMINARI*
Parisi A., Latorre L. , Miccolupo A. , Fraccalvieri R. , Lorusso V. , Normanno G. , Santagada G. pag . 18

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN DUE CASI CORRELATI DI TOSSIFEZIONE DA ENTEROTOSSINA STAFILOCOCCICA IN FORMAGGIO
Gallina S., Bianchi D.M., Caroli D., Cesari L., Cimieri C., Civalleri N., Fabbri M., Corvonato M., Decastelli L. pag . 20

PESTI SUINE: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE
Rutili D. pag . 22

VIRUS INFLUENZALI SUINI H1N2 IN ITALIA: PRESENZA DI CEPPI RIASSORTANTI
Moreno A., Barbieri I., Sozzi E., Lelli D., Fontana R., Alborali L., Cordioli P. pag . 25

CARATTERIZZAZIONE GENETICA E BIOLOGICA DI SRLV GENOTIPO E IN CAPRE DI RAZZA SARDA
Juganaru M., Dei Giudici S., Reina R., Ponti M.N., Bertolotti L., Pedditzi A., Profiti M., Puggioni G., Rosati S. pag . 27

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI ASTROVIRUS AVIARI
Canelli E., Tittarelli C., Barbieri I., Ceruti R. Pennelli D., Lavazza A. pag . 29

MULTIPLEX REAL TIME PCR PER IL RILEVAMENTO DI *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI*, *CLOSTRIDIUM SEPTICUM* E *BACILLUS ANTHRACIS*.
Galante D. , Garofolo G. , Serrecchia L. , Fasanella A. pag . 31

INDAGINE SULLA PRESENZA DI PATOGENI IN TOPI E RATTI DA LABORATORIO DI ALLEVAMENTI E CENTRI DI SPERIMENTAZIONE
Martinelli N., Lombardi G. pag . 33

INTERAZIONE TRA PROTEINA PRIONICA PRPC E LA SUA ISOFORMA TRASFORMATA PRPSC IN OVINI DI RAZZA SARDA
Balzano F., Fresu S., Basagni M., Marongiu A. and Zedda M. pag . 35

STUDIO SULLA PRESENZA DI STAFILOCOCCHI METICILLINO-RESISTENTI IN ANIMALI D'AFFEZIONE
Rossi F., Zoppi S., Bergagna S., Gallina S., Bianchi D.M., Ghiso L., Cagnasso A., Fulghesu L., Goria M., Dondo A. pag . 37

ISTAMINA NEI PRODOTTI ITTICI: OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO MEDIANTE HPLC CON RIVELAZIONE FLUORIMETRICA E DERIVATIZZAZIONE CHIMICA POST-COLONNA
Lo Magro S., Iammarino M., Nardiello D., Campaniello M., Muscarella M. pag . 39

APPLICABILITÀ DEL TEST DI STABILITÀ DEI LISOSOMI IN PESCI D'ACQUA DOLCE E SALATA
Anzalone L., Agnetti F., Tavoloni T., Lestingi C., Susini F., Latini M. pag . 41

COSTRUZIONE DI UN SISTEMA MULTI-SCREENING IN PCR REAL TIME APPLICABILE A MATRICI ALIMENTARI PER IL RILEVAMENTO DI SPECIE VEGETALI GM AUTORIZZATE E NON
Gatto F., Paternò A., Marchesi U., Verginelli D., Quarchioni C., Bonini P., Fusco C., Zepparoni A., Ciabatti I., Amaddeo D. pag . 43

L'ESAME NECROSCOPICO COME SCREENING PER LA DIAGNOSI DI AVVELENAMENTO ACUTO NEGLI ANIMALI: CORRELAZIONI TRA QUADRI ANATOMO-PATOLOGICI E DETERMINAZIONI TOSSICOLOGICHE
Zoppi S., Bergagna S., Rossi F., Grattarola C., Abete M.C., Capra P., Dondo A. pag . 45

INFLUENZA SUINA: DATI ITALIANI
Foni E. pag . 47

ORIGINE ED EVOLUZIONE DELL'EPIDEMIA UMANA DA VIRUS DELL'INFLUENZA A (H1N1)V.
Rezza G. pag . 49

LA TULAREMIA: PATOLOGIA, ASPETTI ZOONOSICI E IMPLICAZIONI BIOTERRORISTICHE
Fabbi M. pag . 50

ENCEFALITE DA ZECCHE IN UN CANE
Zanoni M., Ortolani D.B., Bonilauri P., Gelmetti D., Fabbi M., Cordioli P. e Alborali L.G. pag . 52

PREVALENZA DI PATOGENI IN ZECCHE PRESENTI IN SICILIA
Torina A., Alongi A., Scimeca S., La Barbera G., Vicente J., de la Fuente J., Caracappa S. pag . 54

INDAGINI SULLA PRESENZA DI TOGGENBURG VIRUS (TOV) IN ITALIA
Sozzi E., Boniotti B., Moreno A., Lelli D., Fontana R., Martinelli N., Thuer B., Lombardi G., Cordioli P., Lavazza A. pag . 56

FATTORI DI RISCHIO PER LA DISTRIBUZIONE DI *CULICOIDES* SPP. IN PIEMONTE E RELAZIONE CON LE POSITIVITÀ PER BLUE TONGUE SIEROTIPO 8
Radaelli M.C., Chiavacci L., Barbaro A., Travaglio S., Masoero L., Accorsi A., Goria M., Monnier M., Vitale N. pag . 58

METODI *IN VITRO* ALTERNATIVI ALLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE: PRINCIPI, ASPETTI REGOLATORI ED APPLICAZIONI
Dacasto M. pag . 60

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI SPECIE DI PROTOTHECA MEDIANTE REAL TIME PCR ASSOCIATA AD ANALISI DELLA CURVA DI MELTING
Ricchi M., Cammi G., Merenda M., Garbarino C., Belletti G.L. e Arrigoni N. pag . 62

COMPARAZIONE GENOMICA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE (VTEC) APPARTENENTI A DIVERSI SIERO-PATOTIPI
Imamovic L., Tozzoli R., Michelacci V., Marziano M.L., Caprioli A., Morabito S. pag . 64

APPLICAZIONE DELLA PCR-RFLP PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI LARVE DI ANISAKIS ISOLATE DA PRODOTTI DELLA PESCA
Sciortino S., Palumbo P., Reale S., Macrì D., Costa A. pag . 66

POPOLAZIONE DI *M. BOVIS* NELL' ITALIA NORD-OCCIDENTALE: TRENDS DEGLI SPOLIGOTIPI NEGLI ISOLAMENTI EFFETTUATI NELL'ULTIMO DECENNIO (1998-2008)
Vitale N., Garrone A., Fulghesu L., Goria M., Zoppi S., Rossi F., Dondo A., Bergagna S., Chiavacci L. pag . 68

IDENTIFICAZIONE IMMUNOFENOTIPICA DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE NEL SANGUE E NEL LATTE DI PECORA
Bonelli P., Re R., Pilo G.A., Colorito P., Fresi S., Pais L., Nicolussi P. pag . 70

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULARE DI TOPI INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON *M. BOVIS BCG*
Curina G., Paternesi B., Cagiola M., Montagnoli C., De Giuseppe A., Forti K., Mazzone P., Marcaccio S., Pasquali P. pag .72

IMPIEGO DEGLI ANTIGENI RICOMBINANTI ESAT 6/CFP 10 NEL GAMMA-INTERFERON TEST IN BOVINI INFETTI DA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: DATI PRELIMINARI
Mazzone P., Nardini R., Agnetti F., Biagetti M., Boniotti B., Cagiola M., Caporali A., Ciullo M., Ferrante G., Gradi M., Mangili PM., Pacciarini ML., Papa P., Rosignoli L., Maresca C. pag . 74

POSTERS

LIVELLI PLASMATICI DI SEROTONINA NEL CAVALLO: EFFETTO DEL TRATTAMENTO DEI CAMPIONI IN FASE PREANALITICA
Alberghina D., Monteverde V., Arnone M., Sposito P., Piccione G. pag . 79

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO HPLC-MS PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI FUMONISINE B_1 E B_2 IN ALIMENTI AD USO ZOOTECNICO
Amato G., Marchis D., Mauro C., Ferro G.L., Loria A., Abete M.C. pag . 81

PIANO DI CONTROLLO DELLA RINOTRACHEITE INFETTIVA BOVINA NELLA REGIONE LAZIO: RISULTATI DEL PIANO DI MONITORAGGIO SIEROLOGICO DEL 2007
Autorino G. L., Barone A., Brozzi A., Caprioli A., Della Marta U., Grifoni G., Saralli G., Scicluna M.T. pag . 83

PRESENZA DI *TOXOPLASMA GONDII* IN CARNI FRESCHE, PRODOTTI E PREPARAZIONI DI CARNI ABITUALMENTE CONSUMATI CRUDI IN PIEMONTE.
Barbaro A., Bianchi D.M., Gallina S., Chiavacci L., Pavoni E., Losio M.N., Decastelli L. pag . 85

CONFRONTO FRA IL METODO ISO 6579:2002 E IL METODO ISO 6579:2002/Amd 1:2007 PER LA RICERCA DI *Salmonella* spp. IN CARCASSE DI TACCHINO
Bardasi L., Giommi E., Fontana M.C., Galletti G., Merialdi G. pag . 87

E' ANCOR POSSIBILE DIRE QUALCOSA DI NUOVO SUL CANE CON PIODERMITE?
Beghelli D., Moscati L., Malavolta M., de Cosmo A.M,. Piacenza F., Battistacci L, Mocchegiani E. pag . 89

INDICATORI FECALI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA: STUDIO PRELIMINARE CONDOTTO SU ALLEVAMENTI SUINI PIEMONTESI
Bergagna S., Zoppi S., Rossi F., Adriano D., Traversa A., Careddu M.E., Vitale N., Chiavacci L., Dondo A. pag . 91

STUDIO PRELIMINARE PER LA VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE DI UN TEST IMMUNOCROMATOGRAFICO PER LA DIAGNOSI IN VITA DI TUBERCOLOSI BOVINA
Bergagna S., Zoppi S. , Ippolito C., Rossi F., Vitale N., Chiavacci L., Bertoli M., Dondo A. pag . 93

ANALISI DI PATERNITA'/MATERNITA' COME STRUMENTO DI CONTROLLO PER GLI ORGANI UFFICIALI DI VIGILANZA
Biagetti M., Venditti G., Sebastiani C., Checcarelli S., Ortenzi R., Filippini G., Mazzone P., Medini D., Boni M., Farinelli M., Todini V. pag . 95

CASEIFICAZIONI SPERIMENTALI PER IL CONTROLLO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE CEPPI LATTICI PRODUTTORI DI BATTERIOCINE
Bianchi D.M., Gallina S., Corvonato R., Radium P., Brunetto T., Fragassi S., Decastelli L. pag . 97

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTI (MRSA) IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
Bianchi D.M., Gallina S., Traversa A., Parlato C., Fossati L., Cavallerio P., Mantoan P., Decastelli L. pag .99

UN MODELLO ORGANIZZATIVO PER LA GESTIONE DEI CAMPIONAMENTI E DELLE ANALISI NELL'AMBITO DEL PIANO NAZIONALE RESIDUI
Bortolotti L., Angeletti R., Fabris C., Rostellato D., Breda T., Pengo M., Capello K., Marangon S. pag . 101

CRITICITA' NELLA GESTIONE DELLE QUALIFICHE SANITARIE AZIENDALI DEL PIANO VOLONTARIO IBR IN REGIONE PIEMONTE
Bottero P., Careddu M.E., Cesano L., Fissore E. pag . 102

INDAGINE CONOSCITIVA SULLA PRESENZA DI ALLERGENI IN ALIMENTI A BASE DI CARNE
Campagna M.C., Cavallina R., Condoleo R., Marozzi S., Morena V., Saccares S. pag . 104

L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE: ISOELETTROFOCALIZZAZIONE ED ELETTROFORESI CAPILLARE, DUE TECNICHE DIAGNOSTICHE A CONFRONTO.
Campagna M.C., Bucci E., Bottalico N., Nardoni A., Muratore G., Cavallina R. pag . 106

CAMPIONAMENTO SUCCESSIVO AD UN FOCOLAIO UMANO DI TRICHINELLOSI
Careddu M.E., Ribero A., Bianchi C., Motta A. pag . 108

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA LATTE E PRODOTTI LATTIERO CASEARI: STUDIO FENOTIPICO E BIOMOLECOLARE
Cataleta A., Crisetti E., Latorre L., Normanno G., Chiocco D., La Salandra G. pag . 110

UTILIZZO DELLA LINEA CELLULARE CACO-2 NELL'ISOLAMENTO DEL VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA: CONFRONTO CON METODICHE STANDARD
Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C., Barigazzi G., Foni E. pag . 112

PIANO NAZIONALE RESIDUI – TEST ISTOLOGICO: L'ESPERIENZA DI UN ANNO NELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA
Cocumelli C., Eleni C., Aquilini E., Sala M., Scaramozzino P. pag . 114

BASIC FRAGMENT ANALYSIS PER LA DETERMINAZIONE DEL SESSO NEI VOLATILI
Colussi S., Peletto S., Riina M.V., Zuccon F., Maniaci M.G., Trisorio S., Mignone W., Fornasiero M., Fragassi S., Marengo S., Caramelli M., Acutis P.L. pag . 116

DISTRIBUTORI PER LA VENDITA DIRETTA DI LATTE CRUDO E SICUREZZA DEI CONSUMATORI NELLA REGIONE VENETO
Comin D., Mioni R., Paiusco A., Bordin P., Grimaldi M. pag . 118

CONTROLLO SANITARIO DEI MOLLUSCHI BIVALVI NELLA REGIONE SICILIA: MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO, CHIMICO E BIOTOSSICOLOGICO
Costa A., Cardamone C., Alio V., Grippi F., Napoli C., Vella A., Nifosì D. pag . 120

MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO: EPIDEMIA IN UMBRIA E MARCHE 2008-2009
Costarelli S., Biasini G., Faccenda L., Grazioli S., Mariotti C., Marchi S., Scoccia E., Sensi M., Maresca C. pag . 122

PIANO DI MONITORAGGIO DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE DELLA REGIONE UMBRIA: DATI PRELIMINARI SULLA DIFFUSIONE DI *Listeria monocytogenes* E *Listeria* spp. NEI SALUMIFICI UMBRI
Crotti S., Gattuso A., Cucci S., Gianfranceschi M.V., Bazzucchi V., Bonanno S., Zicavo A., Scuota S. pag . 124

IDENTIFICAZIONE DI ALIMENTI PER USO ZOOTECNICO IRRADIATI A SCOPO CONSERVATIVO E VALUTAZIONE MICROBIOLOGICA DEL TRATTAMENTO RADIANTE
D'Oca M.C., Cammilleri M.C., Giuffrida S.A., Ferrante R., Fuochi P., Macaluso A., Dara S., Arculeo P., Cardamone C. pag . 126

PERCEZIONE DEL RISCHIO TOXOPLASMOSI IN GRAVIDANZA: PROGETTO PILOTA NELLA REGIONE PIEMONTE
Decastelli L., Pivetta E., Griglio B., Sattanino G., Marotta V., Pezzoli L., Massari L., Musella C., Ghiotti M.P. pag . 128

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI ISONIAZIDE IN LATTE BOVINO MEDIANTE HPLC-DAD
Dosio D., Gili M., Migarone E., Olivo F. pag . 130

ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI STAFILOCOCCHI ISOLATI DA CANI AFFETTI DA PIODERMITE: CARATTERISTICHE FENOTIPICHE E GENOTIPICHE DI STIPITI *MEC*A+
Emanuele M.C., Piraino C., Bosco R., Chiarenza J., La Giglia M., Vitale M. pag . 132

DIAGNOSI DI LEUCOSI ENZOOTICA BOVINA MEDIANTE PCR CONVENZIONALE E REAL TIME PCR: RISULTATI PRELIMINARI
Farneti S., Bazzucchi M., Casciari C., Cesarini F., Iscaro C., Marini C., Feliziani F. pag . 134

DEFINIZIONE DEL CUT-OFF DI UN TEST ELISA PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA ATTRAVERSO IL METODO RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC)
Feliziani F., Costarelli S., Bartolini C., Micci E., Vitelli F., Gianfelici P., Fraticelli R., Mariotti C. pag . 136

RISCHIO ZOONOSICO CONNESSO ALLA DETENZIONE DI PRIMATI NON UMANI (NHP): ISOLAMENTO DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* DALL'INTESTINO DI UN MARMOSET COMUNE (*CALLITHRIX JACCHUS JACCHUS*)
Ferrantelli V., Vicari D., Martorana C., Macrì D., Galuppo L., Cicero A., Chetta M., Vitale F., Percipalle M. pag . 138

DATI PRELIMINARI DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE RELATIVE ALL'IGIENE DEL PROCESSO DI PRODUZIONE AUTOMATIZZATA DELLA PIZZA
Ferrari L., Di Stasio S., Debiasi K., Pizzo E., Farina G., Dalvit P., Lucchini R. pag . 140

RISULTATI DEL MONITORAGGIO AMBIENTALE CON LE API NEL COMUNE DI FROSINONE
Formato G., Giacomelli A., Di Giammarino G., Aquilini E., Scaramozzino P. pag . 142

IMPIEGO DI ANTIGENI SECRETORI PRECOCI E DI ESAT6/CFP10 NEL TEST ELISA GAMMA-INTERFERON IN TOPI SPERIMENTALMENTE INFETTATI CON *M.BOVIS* BCG
Forti K., Mazzone P., Paternesi B., Curina G., De Giuseppe A., Bugatti M., Pasquali P., Cagiola M. pag . 144

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE REAL-TIME DI *BRUCELLA SPP* IN LATTE DI BUFALA: DATI PRELIMINARI
Fusco G., Amoroso M.G., Tavano R., Corrado F., Conte F., Iovane G., Capuano F. pag . 146

L'AUTOMAZIONE DELLA PROVA DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO NELLA DIAGNOSI DI BRUCELLOSI NEI PIANI DI ERADICAZIONE IN REGIONE CAMPANIA
Fusco G., Napoletano M., Tagariello T., Guarino A., Bani A., Ferraro A., Iovane G. pag . 148

LE CIANOTOSSINE NELLE ACQUE DOLCI E NEI PRODOTTI ITTICI: RISCHI PER LA SICUREZZA ALIMENTARE E MODERNE STRATEGIE DI MONITORAGGIO
Gallo P., Ferranti P., Fabbrocino S., Guadagnuolo G., Bruno M., Serpe L. pag . 150

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI *NEOSPORA CANINUM* NEI BOVINI: MONITORAGGIO IN PIEMONTE NEL PERIODO 2008-2009
Garrone A., Sant S., Fulghesu L., Monnier M., Lai J., Callipo M. R., Bergagna S., Rossi F., Dondo A., Goria M. pag . 152

VALIDAZIONE DI UN METODO ELISA PER LA RICERCA DI ENTEROTOSSINA DIARROICA PRODOTTA DA *BACILLUS cereus*
Ghia C.A., Gallina S., Buonincontro G., Bianchi D.M., Gemmato A., Liuni F.F., Adriano D., Decastelli L. pag . 154

DIVERSITA' GENETICA DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE DEL BOVINO IN ITALIA
Giammarioli M., Canelli E., Ciulli S., Pellegrini C., Rossi E., De Mia G.M. pag . 156

RILIEVI BATTERIOLOGICI IN SILURI (*Silurus glanis*) PESCATI NELL'ALTO BACINO DEL FIUME PO
Giorgi I., Fioravanti M.L., Minardi D., Guarise S., Forneris G., Florio D., Arsieni P., Scanzio T., Pascale M., Prearo M. pag . 158

SENSIBILITA' AD ALCUNI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *MYCOBACTERIUM MARINUM* ISOLATI DA PESCI
Giorgi I., Zanoni R.G., Florio D., Arsieni P., Fioravanti M.L., Pavoletti E., Prearo M. pag . 160

CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIE ENTERICA* SIEROTIPO NAPOLI: SIEROTIPO "RI-EMERGENTE" IN ITALIA
Graziani C., Busani L., Dionisi A.M., Caprioli A., Luzzi I. pag . 162

IL VACCINO IBR-DELETO: CONFRONTO DEI RISULTATI DEL MONITORAGGIO IN VALLE D'AOSTA DAL 2006 AL 2009
Guidetti C., Palermo P., Ferraris M., Navillod F., Mancano A. & Orusa R. pag . 164

LA BATTERIOLOGIA TONSILLARE NELLA VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI OPPORTUNISTICHE DEL SUINO
Gusmara C., Invernizzi F., Valnegri L., Colombo A., Sala V. pag . 166

IL PRINCIPIO DI PARETO: STRUMENTO DI MIGLIORAMENTO CONTINUO DELLA QUALITA'
Guzzo S., Moriconi M., Palleschi G., Tardiola A. Guarducci M. pag . 168

INDAGINE SULLA PRESENZA DI ACIDO BENZOICO E BENZOATI NEI FORMAGGI: CONTRIBUTO ALLA STIMA DI UN LIMITE AMMISSIBILE
Iammarino M., Di Taranto A., Cristino M., Colucci C. pag . 170

MORTALITA' IN LEPRI SELVATICHE (*Lepus europaeus,* Pallas, 1778) DELLE PROVINCE DI FIRENZE, PRATO E PISTOIA
Lombardo A., Ragona G., Dal Prà A., Paladini I., Piazza A., Tellini I., Taccori F., Corrias F., Brajon G. pag . 172

CYATHOSTOMA BRONCHIALIS IN OCHE DI STEINBACH
Luppi A., Maioli G., Spaggiari B., Gelmetti D., Gibelli L.R., Bonilauri P., Dottori M. pag . 174

DIAGNOSI DI TOXOPLASMOSI IN LEPRE BRUNA EUROPEA (*Lepus europaeus*)
Luppi A., Fontana M.C., Galletti E., Spaggiari B., Maioli G., Bonilauri P., Dottori M., Trocchi V., Merialdi G. pag . 176

ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI BATTERI NEL LATTE DI CAPRE ALLEVATE IN SARDEGNA
Marogna G., Pilo C., Vidili A., Bandino E.,Tola S., Schianchi G., Leori S.G. pag . 178

UTILIZZO DI BIOPSIE MAMMARIE NELL'OVINO DI RAZZA SARDA
Marogna G., Pilo C., Schianchi G., Leori S.G. pag . 180

MONITORAGGIO DELLA TRICHINOSI IN TOSCANA PER LA RICHIESTA DELLA QUALIFICA DI "REGIONE A BASSA PREVALENZA DI *Trichine*"
Martelli S., Mari M., Fico R., Stefanelli S., Corrias F., Brocherel G., Dal Prà A., Ragona G., Lombardo A., Piazza A., Paladini I., Leto A., Brajon G. pag . 182

PARAMETRI EMATOLOGICI E DI IMMUNITA' ASPECIFICA IN POLLI DA CARNE ALIMENTATI CON DIETE CONTAMINATE DA OCRATOSSINA A E INTEGRATE CON LICOPENE
Mellia E., Salamano G., Pozzo L., Rotolo L., Schiavone A., Cavallarin L., Antoniazzi S., Gennero M.S., Doglione L. pag . 184

IMPIEGO DEL CONTROLLO FUNZIONALE POSITIVO SOTTOPOSTO A CONGELAMENTO NEL TEST RAPIDO PRIONICS CHECK PRIOSTRIP: STUDIO DI VALIDAZIONE
Meloni D., Ingravalle F., Cavarretta M. C., Manzardo E., Lo Previte D., Di Vietro D., Nocilla L., Bozzetta E. pag . 186

VALUTAZIONE DELLA ROBUSTEZZA DEL TEST RAPIDO PRIONICS CHECK PRIOSTRIP SU MATRICE AUTOLITICA
Meloni D., Ingravalle F., Cavarretta M. C., Manzardo E., Loprevite D., Di Vietro D., Nocilla L., Maldera O., Bozzetta E. pag . 188

DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITA' *IN VITRO* DI 38 CEPPI DI *A. PLEUROPNEUMONIAE* BIOTIPO 1 ISOLATI NEL 2009 NEI CONFRONTI DI 16 PRINCIPI ATTIVI
Merenda M., Cevidalli A.E., Barigazzi G. pag . 190

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* VEROCITOTOSSINA-NEGATIVI CHE PRODUCONO LA CITOTOSSINA SUBTILASI
Michelacci V., Tozzoli R., Marziano M.L., Caprioli A., Morabito S. pag . 192

VACCINI STABULOGENI IN ACQUACOLTURA: PRODUZIONE E CONTROLLI DI QUALITA'
Minardi D., Goria M., Pavoletti E., Giorgi I., Beltrame R., Arsieni P., Righetti M., Saragaglia C., Prearo M. pag . 194

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EQUINE ROTAVIRUS STRAINS FROM DIARRHEIC FOALS IN NORTHERN ITALY
Monini M., Biasin A., Valentini S., Cattoli G., Ruggeri F.M. pag . 196

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI PRRS: VALIDAZIONE DI UNA METODICA RT-NESTED -PCR E MONITORAGGIO DIAGNOSTICO NEGLI ANNI 2008-2009
Monnier M., Callipo M.R., Lai J., Nappi R., Lacerenza D., Zoppi S., Dondo A., Masoero L., Tursi M., Goria M. pag . 198

VALUTAZIONE DELLO STRESS DA TRASPORTO E DA ADATTAMENTO IN SUINI DA INGRASSO
Moscati L., Pela M., Antolini A., Sensi M., Battistacci L. pag . 200

INDAGINE SULLA PRESENZA DI MELAMINA IN CAMPIONI DI PRODOTTI ITTICI DI IMPORTAZIONE
Nardelli V., dell'Oro D., Decina I., Palermo C., Centonze D. pag . 202

INDAGINI PRELIMINARI SULLA PRESENZA DI CRONOBACTER (ENTEROBACTER SAKAZAKII) NEL LATTE IN POLVERE
Oliveri G., Russo Alesi E. M., Sciortino S., Guida I., Valenti R. M. , Cardamone C. pag . 204

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI SCREENING PER LA RICERCA DI LEVAMISOLO IN LATTE BOVINO MEDIANTE LC-MS
Olivo F., Gili M., Stella P., Benetti C. pag . 206

VALIDAZIONE DI UN METODO DI SCREENING PER LA RICERCA DI AGENTI ANTITIROIDEI IN URINA MEDIANTE LC-MS
Olivo F., Gili M., Savio V., Migarone E., Abete M.C. pag . 208

CARATTERIZZAZIONE SIEROLOGICA E GENOTIPICA DI CEPPI DI *Listeria monocytogenes* ISOLATI DA CIAUSCOLO
Palombo B., Gattuso A., Lanciotti M., Cucci S., Gianfranceschi M.V., Blasi G. pag . 210

IMPIEGO DI UNA METODICA IN CHEMILUMINESCENZA PER IL DOSAGGIO PLASMATICO DELLA TROPONINA I (cTnI) NELLE AFFEZIONI CARDIACHE DEL CAVALLO
Passeri B., Fusari A., Ubaldi A. pag . 212

INDAGINE SUL RUOLO DI AGENTI EZIOLOGICI FUNGINI NEL DETERMINISMO DELLA MASTITE BOVINA
Peano A., Molinar Min A.R., Mastromatteo G., Laurenti M., Mosso P., Rambozzi L. pag . 214

FOCOLAIO DI BVD-MD IN UN ALLEVAMENTO BOVINO AD ALTA PRODUZIONE IN PIEMONTE
Pitti M., Rossi F., Beccaria D., Zoppi S., Peletto S., Bertola G., Masoero L. pag . 216

RICERCA DELLA GLICOPROTEINA E^{RNS} DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA IN CAMPIONI DI CUTE AURICOLARE E DI SIERO CON METODICA ELISA
Pitti M., DeMarco L., Brosio A., Rubinetti F., Gobbi E. , Maglione D., Riva A., Biosa T., Masoero L. pag . 218

PRESENZA DI METALLI PESANTI IN TARTARUGHE COMUNI (*Caretta caretta*) SPIAGGIATE LUNGO LE COSTE PUGLIESI
Prearo M., Squadrone S., Tarasco R., Zizzo N., Appino S., Pavoletti E., Abete M.C. pag . 220

ELETTROCHEMIOTERAPIA ASSOCIATA ALL'USO DI BLEOMICINA IN UN TUMORE CUTANEO DI UN CANE: DATI PRELIMINARI.
Puleio R. , Cassata G., Sardisco F. , Tamburello A., Schiavo M.R., Loria G.R. pag . 222

STANDARDIZZAZIONE DI UN TEST DIAGNOSTICO IMMUNOISTOCHIMICO PER LA RICERCA DI MYCOPLASMA MYCOIDES SUBSPECIE MYCOIDES LARGE COLONY
Puleio R., Tamburello A., Ferrari M., Schiavo M.R., Nicholas R.A.J. , Loria G.R. pag . 224

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA DI ALCUNI DISINFETTANTI USATI IN ACQUACOLTURA MEDIANTE L'UTILIZZO DEL SAGGIO BIOLOGICO CON *VIBRIO FISCHERI*
Righetti M., Abete M.C., Arsieni P., Ultre M., Pavoletti E., Saragaglia C., Squadrone S., Cardente R., Prearo M. pag . 226

MALATTIE DEGLI ANIMALI SELVATICI: LA RETE DI SORVEGLIANZA ITALIANA
Robetto S., Palermo P., Gaffuri A., Gavaudan S., Ferrantelli V., Pasolli C., Pintore A., Di Ventura M. , Scaramozzino P., Di Prisco F., Ianniello M., Guidetti C. , Navillod F.,& Orusa R. pag . 228

INDAGINI SU UNA MORIA IMPROVVISA DI *ANODONTA CYGNEA* NEL LAGO TRASIMENO (UMBRIA)
Rocchegiani E., Di Trani V., Masini L., Ottaviani D., Leoni F., Orletti R. pag . 230

INFEZIONE DA DIARREA VIRALE BOVINA E FATTORI DI RISCHIO IN PIEMONTE: RISULTATI PRELIMINARI
Rubinetti F. , Chiavacci L., Masoero L., Pitti M., Conterbia M., Brosio A., Beccaria D. , Franchini R. , Vitale N. pag . 232

INATTIVAZIONE DI LARVE DI *TRICHINELLA SPIRALIS* IN SALAMI FERMENTATI
Rugna G., Merialdi G., Ramini M., Accurso D., Gelmini L., Mazzini C., Bacchi M., Pozio E. pag . 234

CONFRONTO TRA DIVERSI SISTEMI DI ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE ATTRAVERSO LA VALUTAZIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA
Salamano G., Mellia E., Schiavone A., Tarantola M. , Gennero M.S., Doglione L. pag . 236

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* IN CANI E GATTI: CONFRONTO DEI METODI DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA, AGGLUTINAZIONE DIRETTA ED ELISA INDIRETTA.
Scarpulla M., Pourquier P., Salvato L., Macrì G. pag . 238

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEL BOVINO DI RAZZA PODOLICA PUGLIESE: RISULTATI PRELIMINARI
Scasciamacchia S., d'Angelo F., Carrozzo C. , Garofolo G., Losito S. , Albenzio M. pag . 240

EFFETTO DI ALCUNI PARAMETRI SULLA CRESCITA E SOPRAVVIVENZA DI *BRUCELLA MELITENSIS* IN RELAZIONE AL PROCESSO PRODUTTIVO DEI FORMAGGI OVINI TIPO "PECORINO SICILIANO".
Scatassa M.L., Arcuri L., Carrozzo A., Giosuè C., Lo Biundo G., Santacruz M., Todaro M., Mancuso I. pag . 242

ISOLAMENTO DI STAPHILOCOCCUS AUREUS IN CAMPIONI DI LATTE: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E RELAZIONI CON IL CONTENUTO IN CELLULE SOMATICHE
Scatassa M.L., Mancuso I., Arcuri F., Carrozzo A., Ducato B., Giosuè C., La Giglia M., Lo Biundo G., Guerrero L., Vitale M., Stancanelli A. pag . 244

IDIOPATHIC VESICULAR DISEASE (IVD): SEGNALAZIONE DI UN CASO IN UMBRIA
Sensi M., Catalano A., Salvatori-Franchi F., Orsini S. , Marchi S., Tinaro M., Pecorelli I., Costarelli S. pag . 246

PROCEDURE DI VALIDAZIONE DEI METODI DI PROVA PER L'ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* SPP. DA MATERIALE BIOLOGICO E VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DEI TERRENI COLTURALI UTILIZZATI
Soncin A.R., Zoppi S., Pinto L., Dondo A., Grattarola C. pag . 248

ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN BATTERI GRAM-NEGATIVI ISOLATI DA TAMPONI AURICOLARI DI CANI DI PROPRIETÀ E DI CANILE
Spaggiari B., Gherpelli Y., Carnevali L., Luppi A., Bonilauri P., Dottori M. pag . 250

TIPIZZAZIONE GENOTIPICA MEDIANTE PFGE DI CEPPI DI *SALMONELLA* NAPOLI ISOLATI NELLA REGIONE MARCHE
Staffolani M., Medici L., Luzzi I., Dionisi A.M., Reggiani M.C.., Magi S. [3], Amadori C. [3] Dipartimento Provinciale di Pesaro, Fisichella S. pag . 252

MONITORAGGIO IN SILURI (*Silurus glanis*) PESCATI LUNGO IL TRATTO ALESSANDRINO DEL BACINO IDROGRAFICO DEL FIUME PO: LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DA MERCURIO
Tarasco R., Squadrone S., Leogrande M., Pellegrino M., Guarise S., Giorgi I., Palmegiano P., Pascale M., Prearo M., Abete M.C. pag . 254

TOPI MHV-FREE DA UNA COLONIA CON INFEZIONE ENDEMICA
Torcoli G.,Gregori A., Martinelli N., Lelli D., Lombardi G. pag . 256

CARATTERIZZAZIONE DELL'ANTIGENE AMA1 IN CEPPI DI *BABESIA BIGEMINA* ISOLATI IN ITALIA
Torina A., Agnone A., Sireci G., Mosqueda J., Blanda V., Albanese I., La Farina M., Cerrone A., Cusumano F., Stancanelli A., Caracappa S. pag . 258

GAP DIAGNOSTICO NELLO STUDIO DELLO STATO LIPIDICO DEL CANE
Ubaldi A., Fusari A. pag . 260

VALUTAZIONE DEL GRADO DI CONTAMINAZIONE IN PCB IN SILURI (*Silurus glanis*) PESCATI NEL BACINO IDROGRAFICO DEL FIUME PO (PROVINCIA DI ALESSANDRIA, ITALIA NORD-OCCIDENTALE)
Vivaldi B., Ottonello G., Abete M.C., Pascale M., Guarise S., Ferrari A., Marazzotta G., Tarchino F., Forneris G., Prearo M. pag . 262

QUANTIFICAZIONE DI SPECIE ANIMALI IN MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE PCR REAL TIME
Zampieron C., Costa A., Comin D., Mioni R. pag . 264

ANALISI MOLECOLARE DI CLAMIDIE ISOLATE DA INTESTINO E TAMPONI CLOACALI DI PICCIONI CATTURATI NELLE CITTA' DI MILANO E FERRARA
Vicari N., Laroucau K., Vorimore F., Barbieri I., Sachse K., Hotzel H. , Fabbi M., Labalestra I., Magnino S. pag . 266

RILEVAMENTO DI *CHLAMYDIACEAE* IN AVIFAUNA SELVATICA CAMPIONATA IN PIEMONTE NEL PERIODO 2008-2009
Vicari N., Mandola M.L., Centorbi R., Rizzo F., Andreoli G., Bellotti M., Magnino S. pag . 268

INDICE DEGLI AUTORI pag . 273

Letture plenarie, comunicazioni orali

LE ROSE DI ULISSE : BIOLOGIA MOLECOLARE, ARCHEOLOGIA E LINGUISTICA PER COSTRUIRE UNA NUOVA IMMAGINE DELLA STORIA EUROPEA

dr. Matteo RICCÒ
Università degli Studi di Parma – Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Igiene

tel. 3392994343 – email mricco2000@yahoo.it
indirizzo privato: via Enza n. 3, 43100 – Parma
indirizzo ufficio: via Volturno, n. 39, 43100 - Parma

La storia del continente europeo rappresenta un puzzle che le convenzionali metodiche di indagine archeologica e storica sono difficilmente in grado di risolvere. I primi documenti storici accessibili in nostro possesso risalgono infatti al XIV – XII secolo a.C. : si tratta dei testi palaziali micenei in lineare B, intellegibili in quanto – pur composti in un complesso alfabeto sillabico, decifrato nel corso del XX secolo dall'inglese Michael Ventris, sono espressione della più antica variante del greco antico. Si tratta, tuttavia, di testi molto "poveri", quantomeno secondo il punto di vista del lettore contemporaneo: comprendono quasi esclusivamente registri annonari, ovvero documentazione amministrativa, in cui solo eccezionalmente compaiono accenni alla realtà storica contemporanea – che, comunque, non va oltre alle specifiche esigenze del palazzo e del suo contado.

Al di là dell'indiscutibile valore storico e documentario, cercare di ricostruire le più antiche vicende europee – o quantomeno dell'area geografica dell'Egeo, tramite questa documentazione è come tentare di immaginare la travagliata storia del XX secolo tramite un registro contabile. Relativamente maggior fortuna si ha non appena varcato l'Egeo: gli archivi di Hattusas, capitale del coevo impero ittita, contengono infatti un certo numero di testi letterari e storici. Ad esempio, la loro scoperta e decifrazione ha permesso di scoprire come il leggendario Ramesses II avesse clamorosamente "gonfiato" tramite una propaganda pubblicitaria degna dei nostri tempi gli esiti assai più controversi della battaglia di Qadesh che, combattuta nel XII secolo a.C. fra forze ittite ed egiziane per il controllo della Siria, fu dal grande faraone spacciata come una clamorosa vittoria sul nemico asiatico. O come Esiodo, uno dei più grandi poeti dell'arcaismo greco, avesse risentito, nella composizione delle sue opere pervenuteci ("Le Opere e i Giorni" e la "Teogonia") dell'impronta culturale ittita, sopravvissuta al crollo dell'impero nel corso del XII secolo a.C.

Per chi si interessi della storia europea, in ogni caso, l'utilità di tale documentazione è comunque solo parziale. Nonostante una certa storiografia abbia interpretato l'impero ittita come prima espressione di una potenza "europea", per collocazione geografica (la penisola anatolica) e per interessi politici e commerciali, esso appartiene indiscutibilmente all'area medio-orientale, da cui – all'atto pratico, si distingue quasi esclusivamente per ragioni etnico-linguistiche. Gli Ittiti sono infatti la prima popolazione indoeuropea (o supposta tale) a comparire nelle vicende storiche mediorientali sotto forma di uno stato centralizzato e ben organizzato: la prima storiografia del '900 (soprattutto di area tedesca), spinta da una propaganda di stato volta ad identificare affinità culturali fra mondo ittita e mondo germanico, funzionale al crescere degli interessi tedeschi in area mediorientale, esaltò la cultura ittita come primordio della cultura europea, ravvisando in essa aspetti che in realtà non esistevano.

A testimoniare il fatto che le attenzioni ittite fossero rivolte ad oriente piuttosto che all'occidente (prefigurando la secolare ambiguità di tutte le entità statuali che andranno ad occupare l'area anatolica), nonostante la grande fioritura micenea e quella ittita siano grossomodo contemporaee, la documentazione di Hattusas riserva accenni del tutto sporadici al mondo egeo ed all'Europa in generale. Affascinante, certo, che in questi archivi si parli di una città occidentale chiamata Wilusa ("pericolosamente" affine al termine Ilio, altro nome di Troia) in guerra con certi Ahhiyawa (Achei?) in documentazioni in cui nomi assai famigliari quali Paride, Alessandro, Achille e così via emergono improvvisi e del tutto inattesi.
Detto ciò, risalire tramite documenti storici al periodo ancora più antico, e sicuramente decisivo nella formazione dell'identità europea – a quelle prime fasi di "storia" europea indissolubilmente intrecciate con la fine della "preistoria" è praticamente impossibile.

Su questa mancanza di documentazione scritta, e sulla carenza dei dati archeologici, la storiografia del primo '900 ha ampiamente ricamato: in analogia al citato esempio degli Ittiti come leggendari precursori dell'Impero Germanico, le potenze coloniali europee hanno variamente fatto proprie le diverse civiltà portate alla luce dalla nascente ricerca archeologica, gareggiando nel riconoscere in esse più o meno diretti precursori della propria identità culturale. Basandosi sulla narrazione di Tucidide relativa alla più antica storia greca e su Erodoto, Evans – lo scopritore di Cnossos e del cosiddetto "Palazzo di Re Minosse", immaginò ad esempio la civiltà minoica come un Impero dei Mari (Talassocrazia) assai più simile all'Impero Britannico di sua Maestà Britannica la Regina Vittoria che al mondo minoico quale noi oggi effettivamente abbiamo imparato a conoscere.
Il passo che separa queste fantasiose ricostruzioni storiche (comunque ancora dotate di una base documentale) alle affermazioni pseudostoriche del nazionalsocialismo (che vedeva nel *Volk* tedesco l'ultima e più pura espressione di una primitiva civiltà eurasiatica, esistente piuttosto nei racconti di fantascienza che nella realtà storica), è pericolosamente breve.
Non immaginando le drammatiche conseguenze che tale approccio avrebbe prodotto di lì ad alcuni decenni, la storiografia del tardo '800 immaginò che l'Europa preistorica fosse stata la culla di una remota cultura megalitica (di cui per altro ancora si trova purtroppo traccia nei moderni libri di storia delle scuole medie e superiori) che, in perfetta analogia alle potenze coloniali europee del tempo, si sarebbe quindi diffusa a tutto il continente eurasiatico "portando civiltà" (per usare le formulazioni care agli scrittori del tempo) ed acquisendo da una regione all'altra caratteristiche specifiche. In altre parole, i dolmen ed i menhir propri dell'area nordica, rappresenterebbero l'improvvisa ed ancora primitiva fioritura di una stessa medesima civiltà che quindi avrebbe partorito il cerchio di pietra di Stonehenge, le grandi fortezze micenee, e persino le Piramidi di Giza! I responsabili di questa fiuritura? Le popolazioni che abbiamo già definito come indoeuropee.

Il gruppo indoeuropeo comprende un vasto spettro di lingue diffusesi nel continente Europeo ed Asiatico in un periodo compreso fra il 2500 a.C. ed il 1200 a.C. Se parlare di lingue indoeuropee (fatte salve alcune critiche isolate) è un fatto assolutamente accettato dalla larga maggioranza dei ricercatori, ammettere che ad una lingua indoeuropea si sia associata una cultura, e soprattutto popoli chiaramente definibili come

indoeuropei rappresenta comprensibilmente una tematica tuttora assai spinosa. La scoperta dell'indoeuropeo, inteso come gruppo linguistico da cui molte lingue moderne sarebbero in ultima analisi discese, risale infatti all'epoca romantica (Franz Bopp), in cui l'assioma lingua = popolo era considerato pressoché inattaccabile e la riscoperta dei valori originari del proprio popolo un dovere quasi ineluttabile della ricerca culturale. E quale antichità più remota – e quindi più "nobile" di quella delle più precoci origini? Origini che, per altro, stando alla ricostruzione di Bopp (che per altro noi stessi moderni accettiamo) vedrebbero una sola lingua comune all'origine del Latino, del Greco, di tutte le lingue germaniche, del Persiano, e persino dell'antichissima lingua delle più grandi civiltà indiane – il Sanscrito.
Da qui l'identificazione fra gli indoeuropei ed i cosiddetti popoli megalitici. Identificazione che solo fatti relativamente recenti hanno rimosso: prima di tutto, l'applicazione delle metodiche di datazione (ad esempio, la datazione al radiocarbonio) che permesso di scoprire che le opere attribuite ai "megalitici" fossero in realtà del tutto eterogee dal punto di vista cronologico – comprendendo costruzioni risalenti ad un passato effettivamente remotissimo (fino a 6,000 anni prima di Cristo), ma anche molto più recenti (epoca romana), non essendo quindi omologabili in quando espressione di una sola civiltà. Secondariamente, proprio la datazione al radiocarbonio (primo apporto della moderna ricerca scientifica a discipline storicamente "letterarie" quali l'archeologia e la storiografia) ha permesso di scoprire che la popolazione dell'Europa da parte delle civiltà responsabili delle opere "megalitiche" sarebbe avvenuta per una serie di ondate diverse, accomunate da un solo carattere: provenire dall'oriente, e di cui l'ondata migratoria indoeuropea sarebbe stata solo l'ultima, in ordine cronologico.

Certamente l'Europa è caratterizzata da siti archeologici molto antichi: sulle rive del Danubio, fra il 7,000 ed il 4,800 a.C. fiorì l'insediamento preistorico di Lepenski Vir, già caratterizzata da un notevole sviluppo culturale (testimoniato dal culto dei morti, espressione di viva attività religiosa), tecnico (come sottolineato dalla strumentazione agricola e progettata per la pesca), sociale (i reperti storici suggeriscono che l'insediamento fosse caratterizzato da un minuto sviluppo sociale) e persino artistico. Considerando l'area anatolica come ultima propaggine orientale dell'Europa, proprio in quest'area si trova la più antica città conosciuta al mondo – il cosiddetto insediamento di □atalhöyük, che all'apice della propria fioritura (fra 6,000 e 8,000) fu popolata da quasi 10,000 persone risiedenti in una intricata struttura residenziale in muratura a forma di alveare, arricchita da rappresentazioni pittoriche ed aree cultuali con caratteri di veri e propri templi. Persino nelle estreme propaggini del nord Europa – nelle isole Orcadi, è possibile trovare insediamenti di sorprendente complessità, come quello di Skara Brae, popolato dal 3,100 al 2,500 a.C.

In ogni caso, come emergente da questo rapido excursus e dalla verifica delle date proposte (dal IX millennio di □atalhöyük si passa al IV millennio di Skara Brae) se di diffusione culturale si può parlare attraverso il territorio europeo nel corso della preistoria del continente, questa avvenne sempre, ed invariabilmente, con una sola direzione: da Oriente (cioè dall'Asia e dall'Africa) verso Occidente. Mai il contrario ipotizzato dagli storici inglesi e tedeschi del tardo 1800/primo 1900. Persino la migrazione indoeuropea ebbe origine dall'Asia, e non dall'Europa – che invece fu, al pari dell'India, il sito terminale di una parte di questo evento.

Ciò detto, possiamo ribadire che le modalità di colonizzazione dell'Europa, e soprattutto le vicende che determinarono la conformazione etnografica del continente rimangono confuse, difficilmente districabili dalle più comuni metodiche di indagine archeologica e storiografica prese *per se*– ovvero, la ricerca sul campo e l'indagine di documentazione, primaria (i.e. documenti coevi del periodo oggetto dell'indagine) o secondaria (e.g. rapporti di storici antichi), di cui l'applicazione delle citate tecniche di datazione rappresenta solo la più moderna estensione.

La ricerca sul campo è infatti compromessa dalla forte antropizzazione del continente europeo e dalla sua peculiare storia di civiltà urbane: quasi tutti i siti preistorici si sono infatti trasformati in insediamenti di varia natura (etruschi, celtici, germanici, e così via), quindi convertite in città romane che, in qualche modo sopravvissute alle alterne vicende del medioevo, sono quindi le nostre città moderne. Per restare alla sola Emilia Romagna: la moderna Bologna è il risultato della trasformazione degli insediamenti villanoviani nell'etrusca Felsinea, quindi conquistata dai Celti e da questi ridisegnata a proprio uso e consumo fino alla conquista romana ed alla nascita di Bonomia, precursore della Bologna medievale (basta passeggiare per il centro storico per scoprire, innestate ed integrate nei palazzi due-trecenteschi colonne di chiara origine romana) e quindi della città rinascimentale, e così via, fino ai giorni nostri. Indagare (ovvero: scavare) in questo contesto è chiaramente difficile, se non impossibile: non è un caso che alcune delle più sorprendenti scoperte archeologiche recenti siano state casuali, e legate ai lavori per opere urbane di tutt'altra destinazione (emblematico il ritrovamento degli archivi micenei di Tebe durante gli scavi per la circonvallazione cittadina). Per quanto riguarda l'aspetto documentario, la risposta è ancora più semplice ed in qualche modo deprimente: la documentazione che a noi interesserebbe avere non esiste. Come detto, l'Europa iniziò a "scrivere" (e soprattutto: a scrivere di ciò che noi potremmo chiamare storia, o comunque impiegare per ricostruire la storia) solo in tempi sorprendentemente recenti. Ovverosia, non prima del VI secolo a.C., ed anche in questo caso gli acconti storici presentano ampi varchi. Chi dell'Europa poteva scrivere (riprendiamo l'esempio degli Ittiti) semplicemente non aveva motivo per farlo.
Per meglio capire cosa si intenda, basterà una banale riflessione terminologica. Premesso che il termine Europa sia di etimologia tutt'altro che certa, l'interpretazione più moderna lo vede come derivato di una radice semitica (per l'esattezza, accadica): "*erebu*", ovvero "tramonto / terra del tramonto" (i.e. "occidente") da cui il termine omerico "Erebo". Nel mondo di Omero, l'Erebo (che geograficamente corrisponderebbe al moderno Portogallo) è la terra dei morti. Un luogo in cui i vivi non possono accedere se non in particolarissime condizioni. Avvicinandoci alla nostra specifica realtà, ricordiamo come il più antico nome di Italia (che a sua volta deriverebbe dall'osco *Viteliù*, ovvero "terra dei vitelli") sarebbe Esperia ("terra della sera") – ugualmente associato ad un mondo fantastico. In altre parole: l'Occidente rappresentò a lungo e fino a tempi relativamente prossimi un vero e proprio enigma. Una frontiera nella quale confinare mostri (da Gerione a Scilla e Cariddi) o l'accesso al mondo sotterraneo, ovvero popolata da genti primitivi che, per usare i termini omerici, non sanno distinguere un remo da falce, o sottoposte a misteriose ed incomprensibili divinità – i cosiddetti Iperborei (coloro che vivono sopra il soffiare di Borea, uno dei 4 venti antichi).

Per cercare di superare la barriera rappresentata dalla carenza di fonti storiche dirette, la moderna ricerca può tuttavia avvalersi di strumenti di pari validità scientifica, quali l'indagine linguistica e mitografica e, aspetto subentrato solo nel corso degli ultimi 20 anni, le più avanzate pratiche laboratoristiche – fra le quali, la ricerca genetica.

L'uso dei miti antichi come fonte informativa è in realtà una procedura molto antica: anticamente – quantomeno, fino agli albori della civiltà giudaico cristiana, e quindi per larghi tratti del medioevo, eventi propri del mito erano considerati come storici. Nessun ateniese di età classica avrebbe mai dubitato della realtà storica dei personaggi omerici: non lo fa Tucidide,

ad esempio, che nel "prologo" alla Guerra del Peloponneso parte proprio da fatti narrati nell'Iliade e nell'Odissea e critica l'operato di Menelao ed Agamennone come avrebbe fatto con un generale del suo tempo. Ovviamente, il nostro approccio ai racconti mitici e leggendari non è più quello di una diretta ed acritica accettazione: complice la moderna scuola interpretativa, incarnata ad esempio da Dumezil ed Eliade, l'attenzione della ricerca è ora rivolto – più ancora che al mito in se, al confronto, ovverosia alla comparazione con altri repertori mitici, ed all'analisi della sua forma. Scopo di questo confronto è di riconoscere affinità, strutturali o tematiche, e/o le eventuali divergenze. Questi dati, interlacciati con le informazioni provenienti dalle più convenzionali metodiche di indagine, permettono di ricostruire un'immagine più complessa ed articolata – non priva, tuttavia, di numerosi e critici *caveat*.

Un esempio piuttosto semplice delle conseguenze di questa modalità di approccio alla tematica storica ci viene offerto dall'analisi del mito della creazione greco, narrato da Esiodo. Esso ci narra di tre generazioni divine, in cui da entità confuse e dai caratteri del tutto animistici (Urano, il cielo e Gea, la madre terra) si passa quindi a divinità sempre più antropomorfe (Crono e Rea), fino a diventare in un certo senso "più umane degli stessi uomini" (Zeus e Hera), in cui il passaggio da una generazione all'altra è segnata da conflitti e faide del tutto simili a quelle che un antico greco poteva riconoscere fra le grandi famiglie nobiliari del suo tempo. Sulla base della successione di tre generazioni divine, è stato ipotizzato che anche la Grecia antica avesse conosciuto tre colonizzazioni successive: un modello apparentemente appropriato in cui, da divinità molto primitive legate a fenomeni atmosferici (la prima generazione divina), attribuite alla primitiva popolazione ellenica – i cosiddetti *pelasgi,* termine già impiegato da Tucidide e Plutarco, si sarebbe passati al panteon classico a seguito delle progressive invasioni di popoli (e quindi di cultura: e quindi di dèi) indoeuropei sempre meglio delineati. Zeus, inteso come Dio del Fulmine e leader della compagine divina è infatti una "vecchia conoscenza" per chi si dedica alla mitologia comparata, e del resto già gli antichi (da Erodoto a Tucidide, passando per Cesare e Tacito) procedevano ad una pressoché automatica identificazione di tale divinità con i vari Odino/Wotan (il dio supremo germanico), Indra (il dio delle tempeste indiano), e così via. In realtà, la realtà archeologica ha dimostrato inequivocabilmente che gli dèi venerati in epoca micenea, quindi prima dell'ultima grande migrazione in area ellenica (quella dei Dori), già fossero quelli a noi meglio noti tramite i racconti omerici ed esiodei, demolendo quindi questa parte dell'ipotesi iniziale.
D'altra parte, l'avanzamento della ricerca linguistica e proprio la comparazione mitologica hanno suggerito che le suddette generazioni divine siano associate ad una dinamica culturale assai più complessa. La deificazione di Cielo e Terra è un fenomeno diffuso in culture molto diverse, e del tutto prive di contatti e relazione: la loro presenza nel mito delle generazioni divine è probabilmente spia, piuttosto che di uno strato culturale pre-esistente l'arrivo dei greci storici nell'area ellenica, di uno strato culturale preistorico di questi ultimi. E' invece il secondo strato, quello della generazione di Crono e Rea, a rappresentare un possibile lascito delle popolazioni pre-elleniche e della loro cultura. Prima di tutto, la funzione narrativa esercitata da Crono non è reperibile in analoghi miti della creazione, o comunque non con le caratteristiche proprie del mito greco. La ricerca linguistica ha dimostrato che il nome Crono sia di origine pre-ellenica, derivando da un radicale comune al termine "falce", ed in particolare "falce di luna". Crono, che nella tradizione romana viene identificata con la divinità delle messi (Saturno) sarebbe dunque un'antica divinità implicata sia con i raccolti che con i cicli stagionali, esattamente come la divinità latina (per di più corradicalica) Cerere. Poiché i reperti archeologici ed un controverso passo di Erodoto suggeriscono che il culto delle popolazioni greche più antiche fosse associato a divinità del mondo sotterraneo e dei raccolti (Crono è anche custode del Tartaro, il mondo sotterraneo, prima che il figlio Hades lo rimpiazzi alla fine dell'ultima ribellione divina), è quindi Crono la divinità più propriamente indicata. Esiste inoltre buona evidenza che divinità mediterranee del raccolto e delle messi (come il semitico El) siano strettamente correlate a tale figura.

È a questo punto che entra in gioco la moderna ricerca laboratoristica, ed in particolare l'indagine genetica. Se alla comparsa di una determinata cultura (e quindi di una determinata lingua, dei miti fondatori, di una religione, e così via) si associa infatti il movimento fisico di esseri umani, questo si associa alla comparsa od alla scomparsa del relativo patrimonio genetico.

La ricerca scientifica ha sfruttato varie possibili modalità di indagine genetica rispetto alle popolazioni umane. Le più classiche strategie hanno riguardato la determinazione delle frequenza dei gruppi sanguigni umani, così come del fenotipo Rh-. L'epocale ricerca di Cavalli Sforza ha, per esempio, sottolineato come particolari popolazioni europee siano caratterizzate una prevalenza estremamente elevata del suddetto fenotipo. Poiché questo appare più frequente in area mediterranea, ed in regioni storicamente caratterizzate da culture sostanzialmente slegate dalla "koiné mediterranea" tanto cara alla cultura classica – come l'area pirenaica ed i paesi baschi, l'area anatolica e, in misura minore, la Toscana, esso è stato considerato un classico marcatore dei popoli europei più antichi. In realtà, i gruppi sanguigni rappresentano solo una, e forse la più rozza, delle strategie di indagine applicabili e che possono riguardare la ricerca di specifiche mutazioni di determinati geni, la cui particolare prevalenza in una data popolazione può essere considerata conseguenza del più classico effetto fondatore. Un esempio molto noto è quello di HFE, il gene implicato in una specifica variante dell'emocromatosi idiopatica: la mutazione, originata in epoca storica in area scandinava, ha quindi seguito le migrazioni del clan ancestrale, diffondendosi nell'Inghilterra Orientale ed in Scozia, in Francia settentrionale, ed in alcune zone dell'Italia meridionale. Un altro esempio è quello della cosiddetto *sickle cell disease* (anemia a cellule falciformi): una mutazione di singolo nucleotide determina in tale patologia la formazione di emazie deformi (da cui il nome), che però in condizione di eterozigosi garantiscono un vantaggio selettivo nei confronti dell'infestazione da *P falciparum*, l'agente eziologico della malaria. Per quanto essa sia comparsa in varie popolazioni, in tempi ed in modi diversi, nell'area mediterranea essa raggiunge i massimi livelli di prevalenza in aree oggetto della colonizzazione fenicia a partire dal XII secolo a.C. - quindi Africa settentrionale, Italia meridionale ed insulare. Anche mutazioni assai più frequenti a livello di popolazione si sono rivelate marcatori di antichi eventi migratori: è il caso della celebre mutazione DF508 del gene dei canali del sodio, riscontrato in corso di fibrosi cistica. Il gene mutato è presente in condizione di eterozigosi con prevalenza media di 1/50 nella popolazione europea (da cui la prevalenza di 1/2500), di cui è del tutto esclusivo. In altre parole, il gene della fibrosi cistica può essere considerato un marcatore delle migrazioni dei più antichi popoli europei, ed in particolare proprio della migrazione indoeuropea.
Tornando all'esempio dell'antico mondo ellenico, ricerche condotte sul fenotipo HLA hanno rilevato come la moderna popolazione greca sia il risultato della progressiva stratificazione di pool genetici: in molti casi, essi sono stati agevolmente identificati in base ai dati storici (è il caso di geni associati a popolazioni turche), ma un'ampia base genetica, comune con popolazioni dell'area mediterranea, può essere spiegata come lascito delle più remote popolazioni agricole dell'area ellenica, sulle quali le successive migrazioni indoeuropee sarebbero andate a sovrapporsi.

Questa vicenda di sovrapposizioni, suggerita dai reperti archeologici è dunque confermata dalla ricerca genetica, che tuttavia non è in grado di determinare con certezza il periodo storico in cui l'evento avrebbe avuto luogo – il che rende dunque essenziale il costante incrocio delle diverse fonti informative. Sebbene sia stato osservato che tali frequenze geniche proprie dell'area ellenica potrebbero trovare una spiegazione in eventi storici medievali (le invasioni araba, slava, avara e turca), è pur vero che la ricerca linguistica ha chiaramente dimostrato che in quasi la metà del vocabolario di base del greco antico non sia effettivamente ricostruibile una radice indoeuropea. Questo può essere solo parzialmente spiegato nell'ambito di potenziali prestiti linguistici, in particolare con l'area del vicino oriente. Ancora una volta, l'archeologia ci dice che, quantomeno fino alla nascita delle grandi potenze imperiali assira e persiana, la Grecia continentale guardasse più ad oriente che ad occidente – e con gli scambi culturali arrivano stilemi artistici, e soprattutto terminologie e nuove parole che vanno ad arricchire il vocabolario di un popolo, affiancandosi o sostituendo termini preesistenti.

La ricerca linguistica, condotta sui più antichi testi greci a nostra disposizione, dimostra che buona parte di queste parole siano state importate nel vocabolario comune del mondo greco assai prima che questi scambi si installassero in modo stabile. Da rilevare che questo vocabolario presenta particolarità specifiche a livello di significato e di significante (ovvero di aspetto fonetico): quasi tutti i nomi della flora e della fauna propria dell'area mediterranea presentano fatti e fenomeni linguistici che possono essere spiegati solo come esito di importazione da un sostrato linguistico preesistente, con caratteristiche fonetiche, per altro, del tutto diverse dal mondo semitico ed anatolico. Un sostrato, per di più, comune a buona parte delle culture di derivazione più o meno diretta dal mondo indoeuropeo ed installatesi nell'area mediterranea. L'esempio più celebre è rappresentato dal termine "*rodon*", "*rosa*" in latino in cui si rileva una particolare alternanza consonantica fra s/d, analoga a quella riscontrabile nel nome dell'eroe omerico meno "indoeuropeo" che si possa immaginare – Ulisse (*Odusseus/Ulixes*) o nel termine per "lacrima" (*dacruma/lacruma*). Una regola molto semplice della linguistica, teorizzata da DeSaussurre nel corso del secolo scorso, è che suoni "instabili" (l'instabilità è determinata dalla necessità di articolare in modo particolarmente complesso l'azione degli organi fonatori) evolvano per semplificazione verso suoni più "stabili" (e quindi più semplici da articolare). In altre parole, per giustificare questa particolare alternanza fonetica, è stato ipotizzato che quel pool terminologico deriverebbe da una o più lingue (oggi perdute) caratterizzate da suoni complessi, estranei alla fonetica indoeuropea, ed acquisiti dalle lingue indoeuropee a prezzo di semplificazione dei suoni complessi, con modalità diverse da una lingua all'altra.
A questo strato remotissimo è stato dato il nome di "mediterraneo" o "pelasgico" (sempre dal nome delle più antiche popolazioni che, stando agli antichi greci, avrebbero popolato l'area mediterranea). Chi fossero queste popolazioni è tutt'altro che chiaro. Ancora una volta, l'indagine genetica suggerisce che si tratterebbe di popoli emigrati dal continente africano – o forse dall'area asiatica, al termine dell'ultima glaciazione e che avrebbero uniformemente popolato l'area europea fino all'arrivo delle popolazioni indoeuropee. Questa ricostruzione viene confermata dall'indagine sui geni del grano e dei principali cereali coltivati in area europea, sia in epoca storica, che contemporanea, che rinvenuti in reperti archeologici. Ancora una volta, la ricerca genetica conferma le ipotesi archeologiche e ribadisce come il flusso informativo – e probabilmente etnico, sia sempre stato verso l'Europa, piuttosto che dall'Europa, proveniente dall'Africa settentrionale e dall'Asia occidentale.

Secondo l'interpretazione classica, i popoli indoeuropei avrebbero esercitato un'inarrestabile forza d'impatto grazie alla particolare struttura sociale, in cui un sistema di caste (quello indiano di epoca storica sarebbe derivato proprio dall'originaria stratificazione indoeuropea) sosteneva l'esistenza di un classe di guerrieri professionali, cui la disponibilità di armi "hi-*tech*" (per gli standard preistorici) quali il cavallo, il carro e l'arco da guerra, avrebbero dato un vantaggio sostanzialmente non pareggiabile né dal numero né dalla conoscenza del territorio delle popolazioni stanziali.

La migrazione indoeuropea sarebbe iniziata nel corso del III millennio a.C., originando dall'area del mar Caspio. A suggerire tale areale di origine sono vari fatti, ancora una volta archeologici, mitografici, linguistici e genetici.

Per prima cosa, i dati archeologici dimostrano che a partire dal III millennio a.C. determinate tipologie sepolcrali originarie dell'area suddetta, con presenza di specifiche armi (come appunto l'arco) si diffondono per cerchi concentrici verso oriente e verso occidente. Non va comunque dimenticato che la migrazione della cultura non sia necessariamente associata alla migrazione dei popoli, e che l'adesione ad una cultura non significa necessariamente una sostituzione etnografica (ad esempio: le popolazioni ungheresi sono affini a quelle germaniche e slave, ma parlano una lingua del tutto dissociata da quelle circumvicine; la Persia moderna manifesta una radicale islamizzazione della propria cultura, ma questo non ha significato né l'adozione dell'arabo come lingua né tantomeno la sostituzione dell'etnia persiana) senza contare che non si ha la certezza che questi popoli siano effettivamente identificabili negli indoeuropei.
L'estrema antichità di questa migrazione ha ovviamente impedito la conservazione di reperti storiografici (diversamente dalle migrazioni dei popoli medievali – le invasioni barbariche dei libri di scuola), ma che eventi drammatici abbiano colpito l'Europa preistorica, con un confronto fra popoli nomadi provenienti dall'Asia e popolazioni agricole residenti è suggerito da alcuni reperti archeologici e confermato da una vasta base mitografica.
L'Edda di Snorri (testo redatto nel medioevo, ma contenente accurata descrizione di miti risalenti all'epoca preistorica) ci racconta che gli Asi, divinità provenienti dall'Asia (sic), nelle quali sono facilmente riconoscibili omologi delle divinità olimpiche (ovvero: il panteon di base del mondo indoeuropeo), avrebbero avuto un aspro e sanguinoso conflitto con i primitivi signori del mondo, i Wani (termine corradicalico di Venere), esseri ugualmente divini strettamente associati con la sfera delle fertilità e con i cicli dei campi coltivati e della natura. Non casualmente, i due Wani più importanti sono Freyr e Freya, divinità associate alla sfera sessuale e germinativa (vedasi il latino *fruor*), ed a tutto l'ambito della magia. Sempre stando al mito nordico, Odino avrebbe acquisito potere dai e sui Wani nel corso della propria ascesa al sommo potere fra gli dèi, probabilmente trasmettendo il ricordo di una prima fase di incontro-scontro con le popolazioni pre-esistenti, e delle prime fasi della fusione dei popoli più antichi e di quelli immigrati (non a caso, la sposa di Odino è Frigg, ugualmente derivante dalla radice di *fruor,* o addirittura Freya secondo altre versioni).

Cosa abbia determinato l'originaria migrazione indoeuropea è tutt'altro che chiaro. Esiste un resoconto storico di Ammiano Marcellino, quindi di età relativamente recente (IV secolo d.C.), secondo il quale a scatenare le più antiche migrazioni di Celti e Germani sarebbe stata una disastrosa inondazione, il cui ricordo era conservato dalle relative caste sacerdotali.

Poiché il T0 della migrazione indoeuropea corrisponde in modo sorprendente con la forbice temporale per le grandi inondazioni di cui i miti del diluvio mesopotamici (dal diluvio di Utnapishtim a quello biblico) conservano il ricordo, è stato ipotizzato che la

scintilla della migrazione indoeuropea possano essere stati sconvolgimenti climatici nell'area compresa fra Mar Nero, Mar Caspio e Mesopotamia settentrionale.

A confermare ulteriormente questa ricostruzione è nuovamente una fonte letteraria, indipendente dal mito del diluvio, avvalorata da dati genetici.

Nel racconto del *Ragnarok*, la cosiddetta "apocalisse nordica" (o "crepuscolo degli dèi"), pervenutaci in una redazione islandese del X secolo d.C., viene descritto come le divinità sopravvissute alla "resa dei conti" fra le diverse forze della natura e destinate ad aprire un nuovo ciclo temporale, entreranno in possesso delle "*tavole del destino*". Un passo piuttosto enigmatico, giacché i suddetti "oggetti" non sono reperibili in nessun altro mito nordico conosciuto. E che trova l'unica, sorprendente, analogia, con la conclusione dell'*Enuma Elish,* un testo sumero del IV millennio a.C., in cui una guerra fra diverse generazioni di dei – culminante a sua volta in una vera e propria apocalisse, è proprio incentrata sul possesso delle suddette "*tavole del destino*". Analogia ancor più sorprendente quando si pensi che i primi versi dell'*Enuna Elish* ("*quando in alto il cielo non c'era...*") echeggiano in modo assai sospetto i primi versi del mito della creazione norreno ("*in principio il cielo non c'era...*"), sebbene a separare questi versi sia un vero e proprio abisso geografico, culturale e cronologico (quasi quattromila anni).

Certamente, questi riscontri potrebbero essere solo analogie casuali (il risultato, per così dire, di un'evoluzione parallela), ma come si diceva alcuni dati genetici ci portano ad ipotizzare non soltanto che la migrazione indoeuropea abbia avuto inizio nel 2500 a.C. - e quindi nella fascia cronologica sospetta, ma anche con l'epicentro di cui sopra, nelle aree geografiche di cui sopra, interessando nelle sue aree di origine anche l'area nord-mesopotamica. Pertanto, i reperti citati potrebbero essere un vero e proprio "fossile" letterario, determinato dal particolare ambito di riferimento (quello religioso).

La delezione del recettore per le chemochine CCR5 (*CCR5-delta 32*) è infatti un carattere genetico ampiamente diffuso nelle popolazioni europee, distribuendosi sui due versanti del mar Caspio con andamento sovrapponibile a quello delle due principali branche delle lingue indoeuropee (gruppo occidentale o centum e gruppo orientale o satem, così detti dalla diversa pronuncia del numero 100, a sua volta determinata dal diverso trattamento fonetico del radicale più primitivo), dei gruppi sanguigni, degli ambiti culturali considerati indoeuropei. La suddetta mutazione offre una certa resistenza costitutiva per i suoi portatori nei confronti di alcune infezioni virali, come HIV, e garantirebbe resistenza anche nei confronti di *Y pestis*, l'agente eziologico della peste bubbonica. I primi studi sull'argomento avevano ipotizzato che *CCR5-delta 32* fosse il risultato di una selezione darwiniana subentrata all'epoca della Peste Nera del 1348.
In realtà, la presenza del gene in aree sostanzialmente trascurate dall'epidemia (e quindi non oggetto della suddetta selezione) e piuttosto caratterizzate da un profondo isolamento geografico sin dall'epoca pre-romana (e.g. le isole della Dalmazia), ovvero in aree del tutto ignorate dall'epidemia del 1348 (l'area caucasica e centrasiatica) ha suggerito che la diffusione di tale carattere genetico sia estremamente più remota. Poiché *Y pestis* è emerso come patogeno in epoca storica, e poiché la forbice ipotizzata vede il fatidico 2500 a.C. dell'originaria radiazione indoeuropea come perno centrale, è ugualmente possibile che la migrazione sia stata avvantaggiata da una maggiore resistenza delle popolazioni migranti nei confronti di questo specifico patogeno – o di patogeni simili, attualmente ignoti ed ugualmente impieganti il CCR5 come recettore di adesione.

I semplici esempi qui proposti dimostrano che le indagini genetiche siano quindi diventate un essenziale strumento di ricerca storiografica, affiancandosi a metodiche più tradizionali, che vanno ad integrare e completare. Con risultati talora sorprendenti. Un caso molto particolare è rappresentato dal secolare problema dell'origine degli etruschi. I cosiddetti Tirreni, o Rasna (nome che essi stessi si davano, a quanto ne sappiamo), fiorirono nella penisola italica nel corso del I millennio a.C., dando vita ad una civiltà del tutto particolare, che ha esercitato estremo fascino sui popoli del mondo antico, e sui moderni. In ragione della capillare diffusione di stilemi artistici di area orientale piuttosto che greca, scrittori antichi ipotizzarono che i Tirreni fossero il risultato di una migrazione preistorica proveniente dall'Anatolia. Questo, quantomeno, il resoconto storico di Erodoto: stando al celebre storico ateniese, l'élite di alcune popolazioni della Lidia (una regione dell'Anatolia meridionale) sarebbe stata spinta all'emigrazione da anni di gravissima carestia, giungendo infine alle coste dell'Italia e lì installandosi, e quindi fondendosi con le popolazioni italiche originarie.
L'evento sarebbe successo tra il XIV ed il XII secolo a.C. - un periodo anche in questo caso molto sospetto, in quanto corrispondente al tracollo della civiltà minoica ed al tracollo delle strutture statuali egizie del tempo. Non abbiamo ovviamente prove che tali eventi siano simultanei ma, poiché si ha buona evidenza che a provocare almeno la fine della potenza minoica sia stata l'esplosione dell'isola di Santorini, con il conseguente tsunami ad investire le coste di tutto il mediterraneo orientale, ipotizzare che effettivamente aree anatoliche siano state ugualmente investite e duramente colpite non è affatto improbabile.
L'archeologia, da cui la sostanziale ribellione di Sabatino Moscati e Massimo Pallottino a quest'interpretazione degli Etruschi come popolo dell'Oriente, non rivela in realtà una radicale cesura fra le civiltà centro-italiche del tempo (ed in particolare, la cosiddetta "cultura villanoviana") e le prime fasi della cultura cittadina etrusca. Anche i caratteri fortemente orientalizzanti della società etrusca possono essere interpretati nell'ambito della già citata koiné mediterranea: l'analoga orientalizzazione del mondo ellenico coevo ci sfugge solo a causa della sistematica azione distruttiva esercitata dall'età classica ed ellenistica sulle grandi opere urbane e cittadine del mondo greco delle origini, e che invece traspare immediatamente una volta esaminati i reperti del tempo fino a noi sopravvissuti (spesso proprio tramite i monumenti sepolcrali etruschi).
Anche per quanto riguarda gli aspetti più misteriosi della civiltà etrusca – ovverosia la lingua e la religione, non è necessario chiamare in causa un'emigrazione dall'oriente. La lingua etrusca non rappresenta, di per sé, un mistero inestricabile. Semplicemente, ci mancano i testi. Benché il mondo etrusco abbia prodotto una grande mole di prodotti letterari – così di raccontano gli antichi, ed in prima persona nientemeno l'Imperatore Claudio, autore di una Storia Etrusca purtroppo perduta – essi non sono sopravvissuti al II secolo d.C. ed alla sistematica romanizzazione dei popoli dell'area toscana. I nostri tentativi di approcciarci alla lingua estrusca sono limitati dal fatto che i documenti a nostra disposizione sono niente di più che qualche lapide tombale, incisioni su oggetti (vedasi il fegato di Piacenza) e qualche documento di valore legale. L'analisi linguistica ha rivelato come l'Etrusco sia una lingua a carattere agglutinante, come le lingue ungro finniche (ovverosia l'ungherese ed il finlandese, ma anche come il turco, e come molte lingue asiatiche ovviamente non connesse all'evoluzione della società etrusca): è stato ipotizzato che esso sia strettamente imparentato con il basco, il che renderebbe queste due realtà espressione di una civiltà pre-indoeuropea (diciamo pure "mediterranea") giunta, ad una piena maturazione. Chi sostiene questa ipotesi, sottolinea che gli Etruschi praticassero una religione in cui divinità del mondo sotterraneo rivestissero

un ruolo primario, in sostanziale analogia a quelle popolazioni pre-elleniche di cui Erodoto aveva potuto studiare la lingue e le usanze perché isolate sulle più remote montagne greche. Su quest'ultimo punto va tuttavia sottolineato come le divinità etrusche, piuttosto che ctonie, fossero celesti (in analogia al panteon indoeuropeo), quantomeno nelle prime e più remote fasi, acquisendo caratteri ctoni solo in una seconda e più recente frase.
D'altro canto, tali argomentazioni, anche pienamente accolte, non bastano ad escludere l'ipotesi erodotica. Per prima cosa, popoli dell'Asia minore emigrati in occidente avrebbero potuto importare una cultura mediterranea affine a quella riscontrabile nel territorio di arrivo – evento tanto più probabile se si accetta una certa uniformità delle popolazione e delle culture mediterranee alla vigilia della radiazione indoeuropea (ancora in corso all'epoca della supposta migrazione in occidente delle popolazioni anatoliche). Ed il loro impatto non sarebbe stato necessariamente quello di un'esplosione o di una rivoluzione – ma piuttosto un effetto simile al lievito: l'importazione di tecnologie avanzate provenienti dal più civilizzato oriente, e di nuovi animali avrebbe piuttosto consentito l'accelerazione dell'evoluzione sociale.
Ad avvalorare questa possibilità, la celebre "stele di Lemno", incisa con caratteri alfabetici molto primitivi, ma molto simili a quelli usati in epoca storica dai popoli etruschi, ed espressione dell'unica lingua a noi nota effettivamente imparentata con l'etrusco. Poiché la posizione della stele sarebbe proprio sulla strada seguita da eventuali emigranti diretti dall'Asia minore all'Occidente, l'idea che essa sia il lascito di questa migrazione è molto suggestiva – sebbene controversa.

In questa situazione confusa, i dati genetici hanno dato una svolta sostanzialmente inaspettata. Per prima cosa, le ricerche di Cavalli Sforza sul DNA mitocondriale hanno sottolineato come la popolazione toscana sia, all'atto pratico, geneticamente più affine ad isolati anatolici (ovvero: a popolazioni che, risiedendo in aree geograficamente delimitate, sarebbero sopravvissute alla robusta iniezione di caratteri genetici nel corso delle travagliate vicende della penisola anatolica) che alle circumvicine popolazioni europee, e non solo.
La ricerca veterinaria ha recentemente dimostrato che alcuni animali da allevamento considerati tipici dell'area toscana (in particolare i buoi di razza chianina) siano direttamente discendenti di un antenato di origine anatolica, ed in questo senso del tutto distinte dalle altre specie bovine allevate in Europa occidentale. Poiché si ha buona evidenza che la razza chianina sia allevata sin dall'epoca Romana, non si può escludere che proprio questi animali siano una prova dell'antica narrazione di Erodoto.

Bibliografia essenziale

Lappalainen et al. Population structure in contemporary Sweden--a Y-chromosomal and mitochondrial DNA analysis. Ann Hum Genet (2009) vol. 73 (1) pp. 61-73

Brown. How ancient DNA may help in understanding the origin and spread of agriculture. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences (1999) vol. 354 (1379) pp. 89-98

Belle et al. Origins and evolution of the Europeans' genome: evidence from multiple microsatellite loci. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences (2006) vol. 273 (1594) pp. 1595-1602

Bodmer. Genetic diversity and disease susceptibility. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences (1997) vol. 352 (1357) pp. 1045-1050

Pellecchia et al. The mystery of Etruscan origins: novel clues from Bos taurus mitochondrial DNA. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences (2007) vol. 274 (1614) pp. 1175-1179

Sampietro et al. Palaeogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences (2007) vol. 274 (1622) pp. 2161-2167

Stenico, L. Nigro, G. Barbujani. Mitochondrial lineages in Ladin-speaking communities of the eastern Alps. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences (1998) vol. 265 (1396) pp. 555-561

B. Mcdonald, W. K. Potts, J. W. Fit. Contrasting genetic structures in sister species of North American scrub-jays. Proceedings: Biological Sciences (1999) vol. 266 (1424) pp. 1117-1117

Sykes. The molecular genetics of European ancestry. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences (1999) vol. 354 (1379) pp. 131-139

Currat et al. The effect of the Neolithic expansion on European molecular diversity. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences (2005) vol. 272 (1564) pp. 679-688

Casalotti, L. Simoni, M. Belledi, G. Y-chromosome polymorphisms and the origins of the European gene pool. Proceedings: Biological Sciences (1999) vol. 266 (1432) pp. 1959-1959

Casalottif, R et al. Y-chromosome polymorphisms and the origins of the European gene pool
Proc. R. Soc. Lond. (1999) pp. 1959-1965

Zhang et al. Genetic studies of human diversity in East Asia. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences (2007) vol. 362 (1482) pp. 987-995

Floreani et al. An open population screening study for HFE gene major mutations proves the low prevalence of C282Y mutation in Central Italy. Aliment Pharmacol Ther (2007) vol. 26 (4) pp. 577-86

Candore et al. Frequency of the HFE gene mutations in five Italian populations. Blood Cells Mol Dis (2002) vol. 29 (3) pp. 267-73

Campo et al. Analysis of haemochromatosis gene mutations in a population from the Mediterranean Basin. Liver (2001) vol. 21 (4) pp. 233-6

Ropero et al. Frequency of the C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in a cohort of 1,000 neonates in Madrid (Spain). Ann Hematol (2006) vol. 85 (5) pp. 323-6

Lucotte et al. A European allele map of the C282Y mutation of hemochromatosis: Celtic versus Viking origin of the mutation?. Blood Cells Mol Dis (2003) vol. 31 (2) pp. 262-7

Milman et al. Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. Clin Genet (2003) vol. 64 (1) pp. 36-47

Distante et al. The origin and spread of the HFE-C282Y haemochromatosis mutation. Hum Genet (2004) vol. 115 (4) pp. 269-79

MICROBIOLOGIC RISK ASSOCIATED WITH FRESH PRODUCE: THE INTERACTION BETWEEN FOODBORNE PATHOGENS AND VEGETABLES

Gad Frankel
Centre for Molecular Microbiology and Infection, Imperial College, London

The predicted massive growth in the world overall population and the proportion of the elderly together with climate change and water shortages pose major global challenges in ensuring food security, both in terms of availability and safety. The geographic and demographic changes are likely to
force unprecedented changes in land usage and agricultural practices (i.e.bringing closer together animal and crop production and the need to recycle
water), which might increase the risk of contamination. Fresh produce, particularly salad leaves that are consumed raw, is becoming an increasingly important source of human infections. Despite the increasing risk to public health little is currently known about the mechanism though which human pathogens bind to leaf surfaces or the plant traits that facilitate bacterial attachment.
We developed an intact-leaf attachment model. Wild type and mutant bacterial strains are grown overnight and diluted before leaf inoculation.
Inoculated leaves are incubated at room temperature for 1 hour or overnight and washed. A section of the inoculated leaf is fixed for examination by fluorescent and electron microscopes. Another leaf section is used to quantify the level of adherent bacteria.
We found that many human bacterial pathogens bind tightly to salad leaves and remain attached following thorough washes. In particular we found that *E. coli* O157 binds leaves via EspA filaments while enteroaggregative *E. coli* (EAEC) binds the epidermis via AAF pilus and the guard cells of the stomata via flagella. Flagella play a role in leaf attachment of *Salmonella enterica* serovar Senftenberg, but not of *S.* Typhymurium. The mechanisms by which other bacterial pathogens bind leaves remain unknown.
A variety of human pathogens bind avidly to salad leaves, representing a potentially important route of transmission, which should be investigated.
Considering that simple washes do not remove attached bacteria, there is a need to develop new strategies to remove attached bacteria from fresh
produce in order to reduce the risk of contamination and pathogen spread.

LA TECNICA DEL MINI-MPN PER LA QUANTIFICAZIONE DI SALMONELLA IN MATRICI ALIMENTARI

Barco L., Lettini A., Mancin M., Antonello K., Marafin E., Ricci A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, Legnaro (PD)

Keywords: quantificazione *Salmonella* spp., MPN tradizionale, MPN miniaturizzato

INTRODUZIONE

Nonostante la normativa comunitaria (Regolamento (CE) No 2073/2005 e Regolamento (CE) No 1441/2007) non preveda un limite per la presenza di Salmonella negli alimenti e pertanto il solo isolamento del patogeno rappresenta un criterio di esclusione del prodotto dal commercio, valutazioni quantitative sui livelli di contaminazione da salmonella nelle matrici alimentari costituiscono uno strumento essenziale per raccogliere dati da utilizzare in studi di valutazione del rischio. Inoltre, la quantificazione del patogeno nelle diverse fasi di produzione rappresenta un valido approccio per verificare l'efficacia dei sistemi di controllo e delle misure di decontaminazione impiegate nell'ambito del sistema HACCP.

Sebbene allo stato attuale non sia disponibile una procedura standardizzata per la quantificazione di *Salmonella* spp., la metodica "Most Probable Number" (MPN) costituisce la tecnica d'elezione soprattutto quando il patogeno è presente in basse cariche (< 100 ufc/g) a fronte di un'elevata concentrazione di flora contaminante, condizioni che spesso si verificano nei campioni alimentari.

Il metodo MPN tuttavia presenta alcuni limiti: risulta infatti particolarmente laborioso e dispendioso in termini di tempo e materiali necessari, poiché si basa sull'analisi di diversi replicati di diluizioni successive del campione.

Un'alternativa al metodo MPN tradizionale (tMPN) è rappresentata dal sistema miniaturizzato (mMPN), che si basa sull'analisi di volumi ridotti delle diluizioni della matrice in esame, come pure di volumi inferiori di campione sottoposto a pre-arricchimento e ad arricchimento selettivo (1). Tale approccio metodologico, sebbene comporti un minor dispendio di terreni colturali e quindi economicamente risulti vantaggioso, potrebbe inficiare l'accuratezza della stima quantitativa, dal momento che l'analisi viene eseguita su un volume ridotto di campione.

Un'altra considerazione da riportare rispetto al mMPN è relativa alle modalità con cui sono allestiti i replicati delle diverse diluizioni. Infatti, il sistema tradizionale richiede la preparazione di un tubo e successivamente una piastra di terreno di pre-arricchimento selettivo per ogni replicato delle diverse diluizioni, mentre il sistema miniaturizzato prevede che i replicati delle diluizioni e i successivi passaggi vengano dispensati in piastre a 12 pozzetti. In tal modo è possibile automatizzare il trasferimento dei campioni attraverso l'impiego di pipette multicanale.

L'obiettivo del presente studio è quello di confrontare il metodo MPN tradizionale (tMPN) e il sistema MPN miniaturizzato (mMPN) per la quantificazione di *Salmonella* spp. in differenti matrici alimentari.

MATERIALI E METODI

Campioni di carne e latte (Tabella 1) negativi per salmonella sono stati contaminati con materiale di riferimento (acquistato presso l'Health Protection Agency, UK), costituito da capsule contenenti S. Enteritidis (SE) o S. Typhimurium (STM) a diversi livelli di contaminazione (da 9 a 400 ufc)

Per ciascun campione esaminato è stata preparata una soluzione madre prelevando 10 g di matrice omogeneizzati in 90 ml di APTS precedentemente contaminati con dischetti di materiale di riferimento.

Preparazione diluizioni tMPN

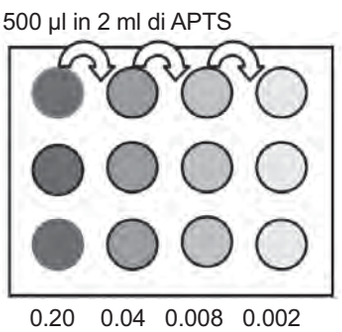
A partire dalla soluzione madre sono state allestite 3 diluizioni in APTS contenenti rispettivamente 1g, 0,1 e 0,01g di campione.

Le diluizioni sono state preparate in triplicato ed incubate a 37 ± 1°C per 18 ± 2h, quindi seminate (0,1 ml) in una piastra di terreno semisolido Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV). Le piastre sono state lette dopo 24 e 48 ore di incubazione a 41,5 ± 1°C.

Preparazione diluizioni mMPN

A partire da 2,5 ml di soluzione madre sono state allestite, per ciascuna fila di pozzetti di una piastra da 12 pozzetti, diluizioni 1/5 in APTS come riportato nella Figura 1. Ciascuna diluizione è stata preparata in triplicato.

Figura 1 *Schema per allestimento delle diluizioni in piastra secondo il metodo mMPN*



La piastra è stata poi incubata a 37 ± 1°C per 18± 2h. Da ciascun pozzetto, utilizzando una pipetta multicanale, sono stati prelevati 20 µl di brodocoltura e inoculati nei corrispondenti pozzetti di un'altra piastra contenente 2 ml di MSRV per pozzetto. Le piastre sono state incubate a 41,5 ± 1°C e lette dopo 24 e 48 ore di incubazione.

Calcolo MPN

Nel caso sia stata evidenziata sciamatura attorno al punto di inoculo nelle piastre di MSRV (tMPN), come pure nei singoli pozzetti delle piastre contenenti il terreno semisolido (mMPN), si è proceduto alla conferma di salmonella secondo il metodo ISO 6579:2002_Cor1:2004. E' stato dunque possibile identificare il numero di replicati positivi per ciascuna diluizione e, utilizzando il software "MPN calculator", attribuire il valore MPN a ciascun campione. (http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html)

Analisi dei dati

Le stime ottenute impiegando le due metodiche quantitative sono state trasformate in log10 al fine di ottenere una distribuzione normale e poter comparare i valori ottenuti attraverso il test T di Student. Dal momento che il metodo MPN fornisce una stima probabilistica del livello di contaminazione del patogeno in esame, espressa come valore MPN e il relativo intervallo di confidenza, per comparare statisticamente le quantificazioni fornite dalle due metodiche rispetto al valore atteso non è stata considerata una differenza pari a 0 tra il valore stimato e l'atteso, bensì è stato ritenuto accettabile uno scarto pari a ± 0.3 log10. Convertendo tale ipotesi in termini di livelli di contaminazione

è stata considerata accettabile la stima quantitativa quando inclusa in un intervallo compreso tra la metà e il doppio del valore atteso. A tal proposito deve essere sottolineato che, per livelli di contaminazione "bassi" come quelli considerati nello studio, gli intervalli di accettabilità risultano piuttosto ristretti (Tabella 2).

Tabella 1: *Tipologia e numero di campioni esaminati. Sierotipi e livelli di contaminazione impiegati.*

Matrice	N° Campioni	Sierotipo	Contaminazione
Latte	22	STM	10 ufc/g
Latte	23	SE	40 ufc/g
Carne	18	STM	1.8 ufc/g
Carne	25	SE	9.2 ufc/g
Carne	12	STM	0.9 ufc/g

RISULTATI

L'analisi dei dati ha permesso di verificare che le quantificazioni ottenute applicando le due metodiche sono comprese negli intervalli di accettabilità fissati per tutte le matrici esaminate, per i diversi livelli di contaminazione e per i differenti sierotipi considerati (Tabella 2).

A livello teorico la situazione ideale si verifica quando si riscontrano contemporaneamente le seguenti condizioni: il valore osservato e il relativo intervallo di confidenza (IC) rientrano nell'IC del valore atteso e il valore atteso rientra nell'IC del valore osservato.

Nella valutazione delle stime quantitative fornite dal sistema MPN tradizionale tenendo conto dei relativi intervalli di confidenza e degli intervalli di accettabilità fissati, è emerso che per 3 delle 5 prove eseguite (latte SE 40 ufc/g, carne ST 1.8 ufc/g, carne ST 0.9 ufc/g) la differenza tra il valore stimato e l'atteso non risulta significativamente ≤ ±0,3 log10. In questi casi infatti l'intervallo di confidenza per il dato osservato non rientra completamente nell'intervallo di accettabilità considerato. Nello specifico, mentre per i campioni di latte contaminati con SE 40 ufc/g il tMPN tende a sottostimare e pertanto la quantificazione ottenuta è prossima al limite inferiore dell'intervallo di accettabilità, per i campioni di carne contaminati con ST a basse concentrazioni (1.8 ufc/g e 0.9 ufc/g) il metodo tendenzialmente fornisce una quantificazione sovrastimata e prossima al limite superiore dell'intervallo di accettabilità.

Per quanto riguarda invece, il sistema miniaturizzato, le stime ottenute mostrano una differenza rispetto al valore atteso significativamente ≤ ±0,3 log10 per tutti i campioni esaminati, fatta eccezione per la matrice carne contaminata con SE 9.2 ufc/g dove il valore ottenuto sottostima l'atteso e il relativo IC non contiene il valore atteso.

Tabella 2: *Intervalli tollerati. Stima delle quantificazioni medie e relativi intervalli di confidenza ottenuti utilizzando il tMPN e il mMPN*

Campione	Range tollerato	Quantificazione tMPN (IC 95%)	Quantificazione mMPN (IC 95%)
Latte ST 10 ufc/g	5-20	9.87 (7.82 ; 12.47)	10.39 (8.13 ; 13.27)
Latte SE 40 ufc/g	20-80	23.46 (16.68 ; 33)	50.70 (38.36 ; 67.01)
Carne ST 1.8 ufc/g	0.9-3.6	3.11 (2.45 ; 3.93)	2.70 (2.07 ; 3.53)
Carne SE 9.2 ufc/g	4.6-18.4	9.28 (6.97 , 12.35)	5.47 (3.98 ; 7.50)
Carne ST 0.9 ufc/g	0.45-1.8	1.73 (1.09 ; 2.73)	1.48 (1.40 ; 1.58)

DISCUSSIONE

Lo studio ha confermato che entrambi i metodi di quantificazione testati risultano attendibili nella numerazione di salmonella in differenti matrici alimentari, anche quando i livelli di contaminazione sono molto bassi.

I dati raccolti hanno permesso di verificare che sebbene il sistema MPN miniaturizzato prevede l'analisi di un quantitativo inferiore come pure volumi minori di brodo di pre-arricchimento rispetto al metodo tradizionale, tali variazioni metodologiche non sembrano influenzare l'attendibilità delle quantificazioni ottenute.

In aggiunta, a differenza del metodo ISO 6579:2002_Cor1:2004 per l'identificazione di *Salmonella* spp. da alimenti destinati al consumo umano e animale, che prescrive l'impiego dei terreni Rappaport-Vassiliadis (RVS) e Muller-Kauffmann tetrationato/ novobiocina (MKTTn) come brodi di arricchimento selettivo, i protocolli MPN utilizzati nello studio prevedevano l'impiego del terreno semisolido MSRV come unico pre-arricchimento. L'accuratezza delle stime ottenute comprova che l'utilizzo del terreno di pre-arricchimento selettivo MSRV rappresenta una valida alternativa anche per l'isolamento di salmonella negli alimenti, come già precedentemente verificato per i campioni della produzione primaria (ISO 6579:2002/Amd1:2007). Tale approccio analitico permette infatti di evitare il passaggio in terreni selettivi differenziali dei campioni riconosciuti come negativi nella fase di pre-arricchimento selettivo, riducendo in tal modo costi e tempi di analisi

Considerati nel complesso, i dati preliminari raccolti incoraggiano l'impiego del metodo MPN per la quantificazione di salmonella in matrici alimentari. In particolare, l'impiego del sistema miniaturizzato oltre a fornite stime accurate, permette di ridurre i costi dell'analisi rispetto al metodo tradizionale e, dal momento che si presta ad un certo livello di automazione, permette di gestire un numero di campioni maggiori rispetto all'approccio tradizionale.

SUMMARY

Although a standardized procedure to quantify *Salmonella* is not yet available, the Most Probable Number (MPN) technique is recognized as the method of first choice. The MPN is useful for the determination of low concentrations of *Salmonella*, but this method presents some drawbacks, as it is time consuming and labour intensive. The alternative to the traditional MPN (tMPN) method could be represented by the miniaturized (mMPN) technique. The mMPN is based on miniaturization of the dilution, pre-enrichment and selective enrichment steps by using 12-well microplates. The objective of the study was to compare tMPN and mMPN to enumerate *Salmonella* in food samples.

BIBLIOGRAFIA

1. Fravalo P., Hascoet Y., Le Fellic M., Queguiner S., Petton J., Salvat G., 2003; "Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: the MINI-MSRV MPN technique" Journal of rapid methods and automation in microbiology 11: 81-88

ISOLAMENTO E GENOTIPIZZAZIONE DI CAMPYLOBACTER JEJUNI DA INFEZIONI MAMMARIE DEL BOVINO

Benedetti V.[1], Gorni C.[2], Mariani P.[2], Piccinini R.[3], Vezzoli F.[1], Luini M.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Lodi;
[2]Parco Tecnologico Padano – Lodi; [3]DIPAV - Facoltà di Medicina Veterinaria – Milano

Key words: *Campylobacter jejuni*, udder infection, AFLP

INTRODUZIONE

Microrganismi del genere Campylobacter sono ospiti abituali dell'ambiente intestinale in diverse specie animali e generalmente non provocano evidenti segni di malattia. Tuttavia possono facilmente contaminare i prodotti alimentari di origine animale nelle diverse fasi della filiera produttiva delle carni e del latte (2). Numerosi studi epidemiologici indicano che il latte crudo ed i prodotti lattiero-caseari non pastorizzati possono essere responsabili anche di veri e propri focolai di tossinfezione alimentare, soprattutto da *C. jejuni* (2,3,9). La contaminazione del latte può essere di origine fecale o da infezione mammaria, come documentato in lavori perlopiù degli anni '80, '90 (1,3,5,6). Gli studi di epidemiologia molecolare condotti a partire da ceppi di origine umana ed animale hanno utilizzato ampiamente la tecnica AFLP che è in grado di evidenziare un alto numero di polimorfismi (4). Tale metodica ha anche dimostrato che *C.jejuni* ha una elevata capacità di variare geneticamente, per esempio in ceppi aviari per ripetuti passaggi sull'animale (8). Il nostro lavoro descrive cinque casi di infezione mammaria da *C. jejuni*, rivelatisi responsabili in altrettanti allevamenti della contaminazione del latte crudo al consumo e riporta i primi risultati delle genotipizzazioni di alcuni ceppi di *C. jejuni* isolati.

MATERIALI E METODI

Allevamenti – I casi sono stati osservati in 5 allevamenti lombardi di Frisone italiane nel periodo 2007-2009. In tutti gli allevamenti era stata da poco segnalata al controllo mensile effettuato secondo il Piano Regionale di controllo sul latte crudo una positività per *C.jejuni* sul latte al distributore. Veniva a questo punto effettuata la ricerca di eventuali capi infetti attraverso una analisi progressiva di *pool* di campioni, fino all'esame del singolo capo. Nel caso degli allevamento B l'animale risultato infetto è stato abbattuto e sono stati prelevati il parenchima mammario dei quattro quarti, il fegato, la bile e il contenuto intestinale di duodeno, digiuno, ileo e colon.

Esame colturale / PCR – I campioni di latte o organi venivano seminati previa dispersione od omogeneizzazione in proporzione di 1 a 10 in terreno liquido di Bolton a 43 C° e dopo 48 ore di incubazione trapiantati su terreno di Skirrow e su MCCD agar attraverso un filtro a 0.45 micron. Dopo 48 ore di incubazione a 43 C° le colonie morfologicamente riferibili a *Campylobacter spp.* venivano identificate con i normali metodi biochimici e con PCR specifica per *C.jejuni* e *C. coli*. La numerazione di *C. jejuni* veniva eseguita con il metodo MPN (Most Probabile Number) o conta delle UFC riferibili a *C.jejuni* su terreno MCCD. La PCR veniva eseguita dal brodo di arricchimento o da colonie sospette, previa estrazione con kit (QIAmp® DNA mini kit). La prova veniva effettuata secondo una metodica descritta in letteratura e da noi lievemente modificata (6,7). Il metodo prevede l'utilizzo di due coppie di primer specie specifici per *C.jejuni* (hipO Fw – 5' GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT 3'; hipO Rw – 5' GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA 3') e per *C. coli* (CC18 Fw - 5' GGTATGATTTCTACAAAGCGAG 3'; CC519 Rw – 5' ATAAAAGACTATCGTCGCCGTG 3') che amplificano rispettivamente frammenti di 344 e 500 bp.

AFLP - L'estrazione del DNA è stata effettuata da colture su terreno solido dei ceppi isolati, mediante l'utilizzo di Kit (Puregene Yeast/Bacteria Kit B Qiagen o QIAmp® DNA mini kit). Il DNA estratto veniva sottoposto a restrizione con gli enzimi EcoRI ed MseI, alla reazione di ligazione con specifiche coppie di primer linker, alla pre-amplificazione mediante PCR non selettiva ed infine alla reazione di amplificazione selettiva AFLP secondo il metodo precedentemente descritto (10). I prodotti della amplificazione AFLP venivano sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e i frammenti visualizzati mediante silver staining. La lettura ed interpretazione dei polimorfismi veniva effettuata per comparazione visuale delle bande e registrazione in modo binario per presenza/assenza. Solo bande alle quali il criterio poteva essere attribuito in modo inequivocabile sono state considerate per le analisi. L'albero filogenetico è stato costruito con il programma PHYLIP.

RISULTATI

Clinica ed esami colturali/PCR - In tutti i 5 allevamenti considerati la ricerca progressiva di Campylobacter dai campioni di latte di pool, capi singoli e singoli quarti mammari, conduceva alla identificazione di un singolo animale eliminatore di *C. jejuni* con il secreto mammario. I rilievi clinici più salienti, le modalità operative per la individuazione dei capi eliminatori ed i risultati degli esami per la ricerca di *C.jejuni* sono riassunte sinteticamente nella Tabella 1. In tutti i casi considerati la rimozione dal gruppo di lattazione del soggetto infetto portava alla negatività per *C. jejuni* del latte di massa aziendale e di conseguenza del latte crudo al distributore.

AFLP – Sono stati presi in esame i ceppi di *C.jejuni* isolati nell'azienda B in diversi tempi e da diverse fonti: latte di massa giorno 0, latte dei 4 quarti giorno 4, latte del quarto infetto giorno 9, mammella-parenchima e mammella-cisterna giorno 9, digiuno, duodeno e bile giorno 9. Nelle prove sono stati inclusi anche il ceppo di riferimento di *C. jejuni* CCUG 25903 e due ceppi di campo di origine bovina, isolati rispettivamente da feci e da latte in due diverse stalle. Come si può notare dall'esame del filogramma ottenuto (Figura 1) i ceppi sono raggruppabili in due *cluster* geneticamente distinti tra loro, che comprendono da una parte tutti i ceppi isolati nella azienda sotto studio e dall'altra i due ceppi di campo isolati da altre aziende. I ceppi isolati nello stesso giorno dal latte e dal tessuto mammario della bovina infetta (ceppi mammari) hanno mostrato una similarità superiore al 90%, cosi come gli isolati da digiuno, duodeno e bile (ceppi enterici). Tra i due gruppi mammario ed enterico l'indice di similarità evidenziato era molto basso e variava fra il 40% e il 60%. Da notare che anche i ceppi isolati al giorno 0 ed al giorno 4 dal latte di massa e dal latte della stessa bovina manifestavano un indice di similarità variabile fra il 56% e il 58% rispetto ai ceppi dei gruppi enterico e mammario, un indice che non permette di collocarli né in un gruppo, né nell'altro.

DISCUSSIONE

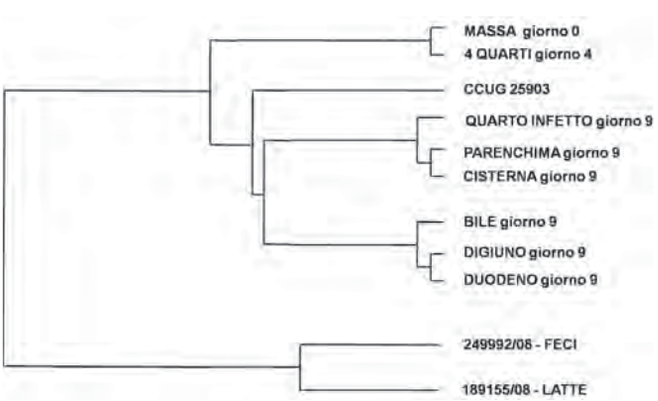
I casi da noi descritti dimostrano che il latte di massa di mandrie relativamente numerose, può risultare contaminato da *C. jejuni* in seguito all'infezione anche di un solo quarto mammario di una singola bovina. Le bovine colpite presentavano un più o meno evidente rialzo cellulare ad indicare una mastite subclinica. Poiché la semplice segregazione delle bovine con infezione mammaria, ha reso non più rilevabile la contaminazione, possiamo ragionevolmente concludere che la eliminazione di microrganismi con le feci, sia stata poco o per nulla rilevante nella

contaminazione del latte di massa. Si pensi che il secreto di un singolo quarto infetto (7/10 litri) è stato in grado di contaminare in maniera rilevabile in coltura grosse quantità di latte di massa, nonostante l'elevata diluizione che avviene nel tank (Tabella 1). La genotipizzazione dei ceppi isolati in tempi e da fonti diverse in uno degli allevamenti porterebbe a ritenere che al momento della macellazione i *C.jejuni* contemporaneamente presenti nel distretto mammario ed in quello enterico, non fossero dello stesso ceppo data la bassa similarità genetica evidenziata con gli AFLP. Analogamente, la pure bassa similarità riscontrata fra i sopraccitati ceppi mammari ed i ceppi isolati 4 e 9 giorni prima dalla stessa mammella e dal latte di massa della medesima azienda, porterebbe alla medesima conclusione. Al momento le possibili spiegazioni di queste osservazioni risiedono nella possibile copresenza di diversi ceppi in diversi distretti dello stesso animale o addirittura nello stesso apparato mammario alternativamente selezionati dall'arricchimento colturale oppure in una rapida variazione genetica del ceppo batterico durante la moltiplicazione nei diversi tessuti dell'animale o nel medesimo tessuto, nei giorni intercorsi fra i due isolamenti. In conclusione si può affermare che in caso di positività del latte di massa per *C. jejuni*, vada sempre presa in considerazione la presenza di infezioni mammarie persistenti come fonte di contaminazione. Ulteriori indagini molecolari aiuteranno la comprensione dei risultati da noi ottenuti e più in generale della epidemiologia dell'infezione da *C. jejuni* negli allevamenti bovini.

Tabella 1 *– Caratteristiche produttive degli allevamenti, modalità di ricerca dei capi infetti, conta delle cellule somatiche (CSS), numerazione di C. jejuni nei capi infetti e numero di quarti infetti sul totale dei quarti in produzione.*

ALLEVAMENTO (CAPI IN LATT. / PROD X G.)	IDENTIFICAZIONE CAPO INFETTO	CSS x1000	NUMER. C.JEJUNI	QUARTI INFETTI / TOT QUARTI
A (270 / 81 Q.LI)	Esame di 5 gruppi di mungitura con identificazione del gruppo "problema"; ricerca da 5 capi con CSS > 300.000	2.150	275/ML (MPN)	1/1080
B (180 / 56 Q.LI)	Esame di 2 gruppi di mungitura con identificazione del gruppo "problema"; ricerca su 19 pool di 5 capi; esame dei 5 capi del pool positivo	150	ND	1/720
C (100 / 23 Q.LI)	Ricerca su 10 pool di 10 capi; esame dei 10 capi del pool positivo	2.317	1450 UFC/ML	2/400
D (130 / 43 Q.LI)	Ricerca su 17 pool di 8 capi; esame degli 8 capi del pool positivo	ND	ND	1/1200
E (108 / 27 Q.LI)	Ricerca su 18 pool di 6 capi; esame degli 6 capi del pool positivo	ND	4200 UFC/ML	1/430

Figura 1 – *Filogramma ottenuto con AFLP dei ceppi di C.jejuni isolati nell'azienda C in tempi e da fonti differenti, di un ceppo di riferimento e di due altri ceppi di campo*.



ABSTRACT

We describe five cases of dairy farms located in the Po Valley, characterised by repeated detection of *C. jejuni* in raw milk for consumption. In all cases the source of contamination of milk was due to a case of intra-mammary infection in a cow. In these farms even one infected quarter of a single cow was able to contaminate the bulk milk of 100 to 270 lactating cows. Although *C. jejuni* could also be detected in the faeces of some animals, the segregation of the subject with intra-mammary infection was effective in eliminating the primary source of contamination, with the result of an undetectable level of the microrganism in bulk milk. The analysis of pooled milk samples by culture and PCR, followed by the individual testing, proved to be an effective tool for identifying the infected subjects. The AFLP analysis of some strains indicates large genetic differences also among the strains isolated in the same farm and from various organs of the same animal.

BIBLIOGRAFIA

1. Gudmundson J, Chirino-Trejo J.M. (1993): A case of bovine mastitis caused by *Campylobacter jejuni*. Zentralbl Veterinarmed; 40(5):326-8.
2. Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. (2007): Campylobacter as zoonotic pathogens: a food production perspective. J. Food Microbiol.; 117:237-257.
3. Hutchinson D.N., Bolton F.J., Hinchliffe P.M., Dawkins H.C., Horsley S.D., Jessop E.G., Robertshaw P.A., Counter D.E. (1985): Evidence of udder excretion of *Campylobacter jejuni* as the cause of milk-borne campylobacter outbreak. J Hyg (Lond); 94(2):205-15
4. Johnsen G, Zimmerman K., Lindstedt B.A., Vardund T., Herikstad H. and Kapperud G. (2006). Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among cattle from South-western Norway and comparative genotyping of bovine and human isolates by amplified-fragment length polymorphism: *Acta Veterinaria Scandinavica* , 1:4; http://www.actavetscand.com/content/1/1/4
5. Lander K.P., Baskerville A. (1983): *Campylobacter jejuni* mastitis in cows: bacteriology and pathology. In: Proceeding of the 2° International Workshop on Campylobacter infection, Bruxelles, september 6-9, 1983. 129-130.
6. Luini M., Benedetti V., Piccinini R., Vezzoli F. (2009): Casi di infezione mammaria da Campylobacter jejuni nel bovino. Large Animal Review; 15(2):51-54
7. Person S., Olsen K.E.P. (2005): Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J. Med. Microbiol. 54,1043-1047.
8. Ridley A.M., Toszeghy M.J., Cawthraw S.A., Wassenaar T.M. and Newell D.G. (2008):Genetic instability is associated with changes in the colonization potential of Campylobacter jejuni in the avian intestine. Journal of Applied Microbiology 105: 95-104
9. Schildt M., Savolainen S., Hänninen M.L. (2006): Long-lasting *Campylobacter jejuni* contamination of milk associated with gastrointestinal illness in a farming family. Epidemiol Infect.; 134(2):401-5.
10. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23, (21):4407-441

RICERCA DI ESCHERICHIA COLI O157 IN CAMPIONI FECALI BOVINI: VALUTAZIONE COMPARATIVA DI UN METODO MICROBIOLOGICO TRADIZIONALE ED UNO IN PCR REAL TIME

Targhetta C.[1], Noli A.[1], Gagliazzo L.[2], Conedera G.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Staff di Direzione Sanitaria, Legnaro (PD)

Key words: *E. coli* O157, feci bovine, PCR real time

SUMMARY
166 individual faecal samples collected from dairy cattle in two different farms, previously shown positive for *E. coli* O157, were tested for this microrganism by two analytical approaches: a traditional microbiological method, including the Immuno-Magnetic Separation technique (IMS) and a real time PCR method, the iQ-Check *E. coli* O157:H7 (Bio-Rad).
Forty samples tested positive with both the methods. The agreement between the methodologies, estimated through the Cohen's K coefficient, was 0,70. Sensitivity and specificity of the biomolecular method, considering the IMS-based technique as the golden standard were 80% and 90,5% respectively.

INTRODUZIONE
Il bovino è considerato il reservoir principale di *E. coli* verocitotossico (VTEC) O157, con localizzazione a livello del tratto gastro-intestinale e possibile escrezione fecale. L'infezione umana, che può determinare gravi patologie, può essere acquisita per varie vie, in particolare attraverso il consumo di alimenti contaminati. Tra quelli più frequentemente coinvolti in casi umani, il latte crudo sta destando negli ultimi anni una crescente preoccupazione. Il suo consumo è in aumento, favorito anche dalla distribuzione tramite erogatori automatici, di crescente diffusione nel territorio nazionale. L'Intesa Stato-Regioni del 25 gennaio 2007, che definisce le misure igienico-sanitarie per la vendita di latte crudo destinato al consumo umano diretto, prevede controlli analitici in allevamento sulle feci, oltre che sul latte, miranti all'esclusione di capi escretori di VTEC O157 dalla produzione di latte crudo.
La dimostrazione della presenza del microrganismo nelle feci non è però semplice in quanto di norma viene eliminato in bassa carica, spesso in modo intermittente e per brevi periodi ed i metodi microbiologici, per un'adeguata sensibilità, devono includere una fase di immunoconcentrazione piuttosto laboriosa. Tali metodi risultano perciò molto impegnativi in caso di analisi di un elevato numero di campioni, come richiesto nel controllo di allevamenti di grandi dimensioni. Sarebbe perciò auspicabile disporre di metodi più rapidi e operativamente più semplici, da utilizzarsi eventualmente come screening preliminare, limitando così l'uso del metodo microbiologico alla conferma dei positivi. Attualmente sono disponibili in commercio vari kit analitici in Real Time PCR, la cui validazione però riguarda l'applicazione a matrici alimentari.
Obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione comparativa di un metodo microbiologico basato sull'IMS e di uno in PCR real time, l'iQ-Check E. coli O157:H7 (Bio-Rad), per la ricerca di *E. coli* O157 in campioni di feci prelevati da bovine di due allevamenti precedentemente autorizzati alla vendita di latte crudo.

MATERIALI E METODI
Sono stati analizzati 166 campioni individuali di feci di bovine di due allevamenti da latte. Questi allevamenti, uno ubicato in Veneto ed uno in Friuli Venezia Giulia, erano precedentemente risultati positivi per *E. coli* O157 nelle feci nell'ambito di controlli effettuati per valutare la presenza di tale microrganismo negli animali e nel latte crudo. Uno dei due allevamenti era associato ad un caso di sindrome emolitico uremica.
Due approcci analitici per la ricerca di *E. coli* O157 sono stati applicati e confrontati: un metodo microbiologico tradizionale ed un metodo biomolecolare.
Il metodo microbiologico utilizzato per l'analisi dei campioni di feci per *E. coli* O157:H7 è basato su quello indicato nell' OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2008) ed include nella procedura analitica la tecnica di immuno-separazione magnetica (IMS). Aliquote da un grammo di feci sono state pre-arricchite in 10 ml di acqua peptonata, precedentemente preriscaldata, per 6 ore a 41,5°C. Dopo incubazione, è stata eseguita l'IMS a partire da 1 ml di brodo di arricchimento, utilizzando Dynabeads anti-E. coli O157 (Dynal, Oslo, Norway) secondo le indicazioni della ditta produttrice, seguita da semina su terreno SMAC addizionato di cefixime 0.05 mg/l e tellurito 2.5 mg/l (Oxoid, Cambridge, UK). Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore, fino a dieci colonie non fermentanti il sorbitolo sono state isolate da terreno CT-SMAC e seminate in Nutrient agar (Oxoid, Cambridge, UK). Ciascuna colonia è stata quindi testata mediante agglutinazione con *E. coli* O157 latex kit (Oxoid, Cambridge, UK). I ceppi positivi sono stati sottoposti a conferma biochimica mediante sistema miniaturizzato API 20E (Biomerieux, Mercy l'Etoile, France) e caratterizzati per la presenza dei geni codificanti le verocitotossine (VT) e il fattore *eae*.
Lo stesso brodo di arricchimento sottoposto ad analisi microbiologica tradizionale è stato utilizzato anche per l'analisi biomolecolare, dopo aver prolungato il periodo di incubazione per altre 2-18 ore (per un totale di 8-24 ore di incubazione). 100 µl di brodocoltura sono stati analizzati con il kit per real time PCR iQ-Check E. coli O157:H7 (Bio-Rad). Le estrazioni di DNA (secondo Easy protocol II) e le reazioni di amplificazione sono state effettuate seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice e contenute nella guida "real-time PCR system user guide for iQ-Check kits". Le analisi in PCR real time sono state condotte con lo strumento MJ Research Bio-Rad Chromo4 Real Time PCR System ed elaborate con gli appositi software (Bio-Rad). Le analisi statistiche sui dati raccolti sono state eseguite con il software Stata 7. L'analisi di concordanza fra le due metodiche è stata eseguita tramite il calcolo dell'indice K di Cohen; la sensibilità e la specificità del metodo in PCR sono state calcolate considerando il metodo microbiologico come golden standard [I.C. 95%].

RISULTATI
I risultati ottenuti con i due approcci analitici sono schematizzati nella Tabella 1. I due metodi hanno fornito risultati concordanti per 145 dei 166 campioni esaminati (87%); esiti discrepanti sono stati rilevati per i rimanenti 21 campioni (13%).
Il livello di concordanza fra i due metodi è stato valutato statisticamente mediante il calcolo del coefficiente K di Cohen.

Tabella 1. Risultati della ricerca di E. coli O157 ottenuti con i due metodi a confronto

		IMS		
		(+)	(-)	Tot
Real time PCR	(+)	40	11	51
	(-)	10	105	115
	Tot	50	116	166

La percentuale di concordanza era 87,35% con un valore del coefficiente K pari a 0,7 ($p<0,01$), corrispondente ad un buon livello di accordo fra le due metodiche. Nella tabella 2 è riportato uno degli schemi interpretativi più utilizzati per il K di Cohen (Landis and Koch, 1977).

Tabella 2. Schema interpretativo per il K di Cohen (Landis and Koch, 1977)

Kappa	**Livello di accordo**
0,00 - 0,20	Concordanza casuale
0,21 - 0,40	Concordanza mediocre
0,41 - 0,60	Concordanza discreta
0,61 - 0,80	Concordanza buona
0,81 - 1,00	Concordanza ottima

La sensibilità e la specificità del metodo biomolecolare sono state calcolate considerando come metodica di riferimento o "golden standard" il metodo tradizionale microbiologico. La sensibilità è risultata di valore moderato e pari all' 80,1%; la specificità ottenuta è da considerarsi buona e pari al 90,5% (Tabella 3).

Tabella 3. Sensibilità e specificità del metodo biomolecolare con riferimento al metodo basato sull'IMS

	Valore	[Intervallo di confidenza 95%]
Sensibilità	80,1%	66,3 - 90,0
Specificità	90,5%	83,7 - 95,2

Per 8 degli 11 campioni risultati positivi con il metodo biomolecolare e negativi con metodo IMS sono state analizzate ulteriori colonie non fermentanti il sorbitolo (NFS) cresciute su terreno CT-SMAC; in 2 di tali campioni alcune delle nuove colonie testate sono risultate positive per E. coli O157. E' probabile che il numero relativamente ridotto di colonie NFS testate in base a quanto prescritto nel protocollo analitico, in un contesto caratterizzato da un gran numero di colonie NFS non-O157 e/o FS, abbia impedito l'individuazione delle colonie di E. coli O157 nella prima analisi.

CONCLUSIONI

Nonostante questo studio comparativo abbia evidenziato un buon livello di concordanza fra le due metodiche, ulteriori indagini saranno opportune al fine di valutare più approfonditamente l'applicabilità dell'iQ-Check PCR kit, in modo particolare del protocollo di estrazione, all'analisi di campioni di feci. Il kit infatti è stato inizialmente messo a punto e risulta attualmente validato solo per l'analisi di matrici alimentari. Alcune fra le discrepanze rilevate fra i due metodi potrebbero, quindi, essere dovute alle caratteristiche della matrice di partenza che, trattata con i reagenti attualmente inclusi nel kit, potrebbe ad esempio non consentire un recupero ottimale dell'acido nucleico.

L'opportunità di ricercare soluzioni che consentano di migliorare la sensibilità del metodo iQ-Check *E. coli* O157:H7 è giustificata dai vantaggi che tale metodica può offrire, che sono la rapidità di analisi e la semplicità operativa. Il metodo biomolecolare, se applicato in fase di screening preliminare, permetterebbe infatti di ridurre i tempi di analisi nel caso di campioni negativi e di limitare l'applicazione del metodo microbiologico tradizionale solo ai campioni positivi, per i quali è comunque necessario l'isolamento e la caratterizzazione del microrganismo.

Va comunque sottolineato che il metodo iQ-Check *E. coli* O157 ha permesso di individuare delle positività che non erano state inizialmente rilevate dal metodo microbiologico; solo a seguito di ulteriori indagini, volte alla verifica di un maggiore numero di colonie NFS rispetto a quelle testate secondo il protocollo standard, è stato possibile isolare il microorganismo confermando la positività in due dei campioni inizialmente negativi in IMS. Questi risultati suggeriscono che, in alcuni casi, il metodo biomolecolare potrebbe offrire il vantaggio di una maggiore sensibilità rispetto a quello tradizionale, ad esempio in campioni caratterizzati dalla presenza di flora batterica aspecifica in alta carica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la ditta Bio-Rad per aver gentilmente messo a disposizione la strumentazione necessaria all'esecuzione delle prove in Real Time PCR ed in particolare la Dr.ssa Caroline Sidi per i suggerimenti offerti ed il contributo all'esame dei risultati ottenuti.

Si ringrazia il personale della Sezione di Pordenone-IZS Venezie per la qualificata assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

1. De Boer E. and Heuvelink A.E. (2001). Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union Concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. 1. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli,* Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y. and McDowell D.A., eds, Int J. Food Microbiol., 66, 25-35.
2. Capiluppi C., Fabbris L., Giancotti G., Meneghello A.M. (1993) STATREE 1.0. Manuale per l'uso, SUMMA Ed., Padova.
3. Landis J. R. and Koch G. G.. The measurement of observer agrement for categorial data. (1977) Biometrics, 33, pp. 159-174.
4. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, (2008) Chapter 2.9.11. "Verocytotoxigenic *Escherichia coli*", pp1294-1304.
5. Provvedimento d'intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana, 25 gennaio 2007.
6. Siegel S. e Castellan N. J. jr. (1992), Statistica non parametrica, McGraw-Hill, Milano.

INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE DA *Listeria monocytogenes* E *Listeria spp.* IN UNO STABILIMENTO DI STAGIONATURA, DISOSSO E AFFETTATURA DI PROSCIUTTO CRUDO: CONFRONTO FRA METODICHE

Chiapponi C.[1], Re M.[2], Pierantoni M.[2], Mazza G.[2], Barigazzi G.[1], Foni E.[1]
1Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Parma;2AUSL di Parma, Distretto di Langhirano

Key words: Real-time PCR, *Listeria. spp, Listeria monocytogenes,* Prosciutto crudo

SUMMARY
A plant for the production of Parma Ham that had shown cases of *Listeria monocytogenes* contamination was monitored for the presence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* by microbiological and bio molecular methods. Along the production process, 193 samples were collected and examined according to FSIS USDA (MLG 8.06) method and by Real-Time PCR method. This method was able to detect more positive samples than the microbiological one. The study permitted to identify some critical points of the production process that were corrected or removed.

INTRODUZIONE
Listeria monocytogenes è un piccolo bacillo Gram positivo ubiquitario la cui resistenza nell'ambiente è sorprendente per un germe non sporigeno. Sopravvive infatti in condizioni molto avverse: si moltiplica in brodo ipersalato, in presenza di acidi biliari, a temperature comprese fra –0,4°C e 50°C e tollera variazioni di pH fra 4,5 e 7,0. L. monocytogenes è attualmente riconosciuto come agente patogeno di origine alimentare. Può determinare nell'uomo infezioni generalizzate con manifestazioni di meningite, setticemia, aborto. La raccolta di dati e l'affinamento di tecniche analitiche hanno consentito di dimostrare l'importanza epidemiologica di alimenti specifici quali vegetali, patè e derivati del latte, in particolare formaggi a pasta molle. In tempi più recenti si sono dimostrati potenziali fonte di infezione anche prodotti carnei che hanno subito trattamenti post letali, termici e/o di stagionatura, e identificati come prodotti "Ready To Eat".Con il Regolamento 2073/2005 (1) e successive modifiche la Commissione Europea si è pronunciata in merito all'applicazione di criteri microbiologici per quanto riguarda la *L. monocytogenes* nei prodotti pronti al consumo indicando l'utilizzo della metodica ISO 11290-1/2. Per questa tipologia di alimenti, e in particolare per il prosciutto crudo stagionato, se destinati all'esportazione negli Stati Uniti, c'è la richiesta da parte delle autorità statunitensi di applicare i controlli microbiologici, con la metodica FSIS USDA (MLG 8.06) secondo il Regolamento Finale pubblicato sulla parte V del Federal Register (Regolamento 9 CFR part 430).
Dal momento che molti stabilimenti della zona di produzione del Prosciutto crudo di Parma, in questi ultimi anni hanno iniziato ad esportare prodotto verso il mercato statunitense, nei nostri laboratori è stata accreditata e viene utilizzata la metodica descritta nel manuale FSIS USDA (MLG 8.06).
In questi ultimi anni si sono rese disponibili anche metodiche biomolecolari che permettono di affiancare a rapidità di risposta una maggiore sensibilità.
In questo ambito è maturato il progetto di controllo della contaminazione da *Listeria* spp e *L. monocytogenes* in uno stabilimento per disosso e affettatura di prosciutto crudo stagionato che aveva presentato casi di positività per *L. monocytogenes* nel prodotto finito. I campioni sono stati esaminati contemporaneamente mediante metodica batteriologica e tramite applicazione Real-Time PCR.

MATERIALI E METODI
Campionamento
Dal termine della fase di stagionatura all'uscita delle confezioni di affettato si susseguivano diverse fasi di produzione: lavaggio e carico, disosso e stampaggio, destampaggio, affettatura. In fase ispettiva sono stati identificati 193 punti critici, successivamente oggetto di campionamento, lungo tutta la filiera produttiva, compresi gli spogliatoi del personale. I prelievi sono stati effettuati negli ambienti individuati sia in fase preoperativa, ovvero dopo la sanificazione ambientale, che in fase operativa. Inoltre è stata identificata una partita composta da 10 prosciutti crudi che sono stati monitorati durante tutte le fasi di lavorazione.
I prelievi sono stati eseguite tramite spugnette sterili. Sulle superfici piane i prelievi sono stati eseguiti su 900 cm^2 sulle altre tipologie di superficie il prelievo è stato eseguito su tutta la superficie disponibile.
Il prodotto finito, 6 vaschette di affettato, è stato campionato all'inizio, metà e fine affettatura della partita oggetto del controllo.
Analisi di laboratorio
Su tutti i campioni sia ambientali che di prodotto è stata eseguita la ricerca di di *L. monocytogenes e Listeria spp.* sia con metodica microbiologica che con Real-Time PCR.
Analisi microbiologica
La ricerca di *L. monocytogenes e Listeria spp.* è stata eseguita applicando metodo normato FSIS descritto in MLG 8.06 rev. 6, sia per l'analisi qualitativa che quantitativa. Il metodo prevede un prearricchimento in terreno Modified of University of Vermont broth, una fase di arricchimento in terreno Fraser, trapianto in terreno solido Modified Oxford Medium e successiva eventuale identificazione delle colonie sospette tramite prove biochimiche miniaturizzate.
Analisi con Real Time PCR
Il DNA è stato estratto da un ml di brodocoltura in Fraser broth con il kit Genelute Bacterial Genomic DNA kit (SIGMA) secondo le indicazioni del produttore. Cinque microlitri di DNA estratto sono stati sottoposti a Real-Time PCR per la ricerca di *Listeria spp* con il kit LightCycler® foodproof Listeria Genus Detection kit (Roche) su strumentazione LightCycler® 1.5. Le corse sono state analizzate con LightCycler® software 3.5. I campioni risultati positivi per *Listeria spp.* sono quindi stati ritestati per ricerca di *Listeria monocytogenes* con il kit LightCycler® foodproof *Listeria monocytogenes* detection kit (Roche) ed analizzati come sopra riportato.

RISULTATI E DISCUSSIONE
I risultati sono stati raccolti considerando sia la presenza di *Listeria spp.* sia di L. *monocytogenes* applicando sia la metodica microbiologica che la metodica biomolecolare. I dati ottenuti sono illustrati nella Tabella 1. Dall'attività di campionamento, mediante spugnatura diretta sull'intera superficie dei prosciutti in osso, è emerso che i prodotti all'uscita dai locali di stagionatura risultavano non contaminati.

L'assenza di contaminazione al termine della fase post-letale è stata confermata anche dai risultati relativi al campionamento effettuato in fase preoperativa ed operativa sulle superfici nei locali di lavaggio dei prosciutti stagionati in osso e nei locali di spedizione dove venivano effettuate le operazioni di preparazione dei prodotti per il trasferimento al disosso. In fase preoperativa si è rilevata la presenza di superfici contaminate da *Listeria spp.* nel reparto disosso e destampaggio. Questo dato ha indirizzato a focalizzare l'attenzione su questi reparti per la contaminazione del prodotto. Nel reparto disosso è risultata critica la zona strumenti per scotennatura e rifilatura e in particolare sono risultati contaminati gli stampi per l'alloggiamento del prodotto prima del congelamento. Effettivamente questi strumenti non permettevano un'agevole ed efficace sanificazione, in quanto presentavano una foggia fissa che, per altro, ormai è stata abbandonata dalla maggior parte degli stabilimenti. Un rilievo di preoccupato interesse è stata la positività per *L. monocytogenes* rilevata in fase preoperativa nei locali destampaggio su alcune strumentazioni e mani operatori. Inoltre sono state riscontrate positività su superfici dei locali spogliatoi in ingresso. Questo dato confermava l'inadeguatezza dei percorsi obbligati degli operatori già riscontrata nella fase ispettiva iniziale.

Per quanto riguarda il reparto affettato, a fronte del riscontro positivo della negatività per *Listeria spp* nel campionamento preoperativo, il prodotto risultava inevitabilmente contaminato, se pur con valore MPN<0.3, dalle manipolazioni subite nei reparti precedenti.

Dal confronto della metodica microbiologica con quella tradizionale è emerso che per ricerca di *Listeria spp.* che *L. monocytogenes* la metodica Real-Time ha dato un maggior numero di positivi ($p<0,005$ con χ^2). Infatti su 193 campioni esaminati sono risultati positivi per *Listeria spp* 46 campioni tramite metodo microbiologico e 73 campioni tramite Real Time PCR. Per quanto riguarda *L. monocytogenes* i campioni positivi sono risultati 30 tramite metodo microbiologico e 49 tramite PCR. Inoltre la valutazione statistica tramite costante K di Cohen ha evidenziato una buona concordanza fra le due metodiche. E' evidente come la metodica biomolecolare sia stata in grado di rilevare una percentuale maggiore di positivi grazie alla sua capacità di rilevare cellule batteriche anche in bassissima concentrazione e poco vitali e si rivela quindi un affidabile metodo di screening. Questa maggiore sensibilità viene ad essere determinante nel rilevare criticità in superfici e prodotti con bassa contaminazione, permettendo così di intervenire in situazioni particolarmente problematiche come quelle della struttura esaminata. Alla luce della oggettività dei risultati sono state intraprese azioni correttive riguardanti la formazione del personale, con verifica dell'applicazione delle norme comportamentali, sostituzione di strumenti obsoleti, modifica delle operazioni di sanificazione, nonché ristrutturazione dei reparti per una corretta circolazione del prodotto e del personale.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Lucia Licchelli, Roberta Manfredi e Eliana Valentini per il supporto tecnico.

BIBIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'unione Europea. Regolamento della Commissione 2073/2005 EC: L 338/331-L338/326

TABELLA 1. Numero di campioni positivi ottenuti tramite metodo microbiologico e Real-Time PCR per campioni eseguiti nelle varie fasi di lavorazione.

Fase di lavorazione	**Matrice**	**Positivi microbiologico**		**Positivi RT PCR**	
		Listeria spp.	***L. monocytogenes***	***Listeria spp.***	***L. monocytogenes***
Preoperative Lavaggio	Prodotto	0/10	0/10	0/10	0/10
	Superficie	0/5	0/5	0/5	0/5
Operative Lavaggio	Superficie	0/5	0/5	0/5	0/5
Preoperative Carico	Superficie	0/7	0/7	0/7	0/7
Operative Carico	Prodotto	0/10	0/10	0/10	0/10
	Superficie	0/7	0/7	0/7	0/7
Preoperative Disosso	Superficie	6/22	3/22	6/22	5/22
Operative Disosso	Superficie	14/22	8/22	19/22	14/22
	Prodotto	1/6	0/6	3/6	1/6
Preoperative Destampaggio	Superficie	2/11	2/11	8/11	3/11
Operative Destampaggio	Prodotto	1/1	0/1	1/1	1/1
	Superficie	9/12	6/12	12/12	9/12
Preoperative Affettato	Superficie	0/22	0/22	0/22	0/22
Operative Affettato	Superficie	3/22	3/22	13/22	4/22
	Prodotto	2/2	0/2	2/2	2/2
Prodotto finito	Prodotto	6/6	6/6 (MPN<0.3)	6/6	6/6
Spogliatoi	Superficie	3/25	2/25	5/25	4/25

CONFRONTO DI AMPLIFIED FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM E MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING PER LA GENOTIPIZZAZIONE DI LISTERIA MONOCYTOGENES - DATI PRELIMINARI

Parisi A.[1], Latorre L.[1], Miccolupo A.[1], Fraccalvieri R.[1], Lorusso V.[2], Normanno G.[2], Santagada G.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata - Foggia;*
[2]*Università degli Studi di Bari, Facoltà di Medicina Veterinaria – Dip. Sanità e Benessere Animale Valenzano (BA)*

Key words: L. monocytogenes, Amplified Fragment Length Polymorphism, Multi-Locus Sequence Typing

SUMMARY
In this survey Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Multi-Locus Sequence Typing (MLST) have been used to study 63 *L. monocytogenes* isolates from food and environmental sources. A total of 47 AFLP types and 45 MLST Sequence Types were identified. AFLP and MLST produced similar results in terms of discriminating power. The Discrimination Index calculated for the two techniques was 0.990 for AFLP and 0.984 for MLST. These values were appreciably higher compared to serotyping (0.743). A good congruence was observed between AFLP and MLST. The present study demonstrated that AFLP and MLST subtyping are suitable tools for studying the epidemiology of *L. monocytogenes*.

INTRODUZIONE
L. monocytogenes è l'agente eziologico della "listeriosi", una importante malattia alimentare ad esito potenzialmente fatale. L'associazione di *L. monocytogenes* con numerosi focolai di tossinfezione alimentare lascia supporre che gli alimenti contaminati possano costituire la principale fonte di contagio per l'uomo. La definizione dell'epidemiologia di *L. monocytogenes* appare complicata dalla estrema diffusione nell'ambiente di tale microrganismo ed inoltre dall'andamento sporadico dei casi che raramente coinvolgono un numero elevato di soggetti. La disponibilità di procedure tecniche in grado di discriminare gli isolati e di definire dettagliatamente la struttura della popolazione dei microrganismi patogeni può concorrere a definire meglio il quadro della prevalenza di *L. monocytogenes* nell'ambiente, negli stabilimenti di produzione, negli alimenti e nelle infezioni umane.
In passato le speculazioni epidemiologiche si sono basate essenzialmente sulle tecniche di sierotipizzazione. Oggi è disponibile un ventaglio di protocolli che consentono di discriminare molto più dettagliatamente i diversi genotipi costituendo una risorsa importante a disposizione dei ricercatori. In questo studio si è proceduto alla genotipizzazione di 63 ceppi di *L. monocytogenes,* isolati da diverse fonti alimentari ed ambientali, mediante Amplified Fragment Lenght Polymorphism (AFLP) e Multi-Locus Sequence Typing (MLST).

MATERIALI E METODI
In totale sono stati analizzati 63 isolati, provenienti da differenti fonti ambientali e alimentari senza correlazioni epidemiologiche. I ceppi sono stati raggruppati in nove categorie in base alle fonti di isolamento: acque (n=3), pesce affumicato (n=2), latte e derivati (n=11), tamponi ambientali (n=6), feci di mammifero (n=3), prodotti carnei (32), prodotti ready-to-eat (n=2), suolo (n=2), vegetali (n=2).
L'identificazione del sierotipo è stata effettuata mediante DENKA-SEIKEN kit (Tokio, Japan) come descritto precedentemente (5).
Gli isolati sono stati sottoposti a tipizzazione mediante AFLP, utilizzando gli enzimi di restrizione *Hind* III e *Hha* I, e MLST come precedentemente descritto (2;3). Per AFLP sono stati fissati due cut-off di similarità: gli isolati che mostravano un livello di similarità (S.L.) >90% sono stati raggruppati nello stesso "gruppo" AFLP che è stato identificato mediante un codice numerico, mentre un valore di S.L. > 95% raggruppava gli isolati nello stesso "tipo" AFLP. L'assegnazione dei singoli alleli e l'appartenenza ai Complessi Clonali è stata effettuata secondo il Listeria MLST database (www.pasteur.fr/mlst).
Le capacità di discriminazione della sierotipizzazione, di AFLP e MLST sono state valutate mediante il calcolo dell'indice di diversità di Simpson (D.I.) come precedentemente descritto (1).

RISULTATI
Gli isolati inclusi nello studio appartenevano a diversi sierotipi: 1/2a (n=27), 1/2b (n=10), 1/2c (n=9), 3a (n=3), 3b (n=2), 4b/4e (n=12). L'analisi AFLP raggruppava gli isolati in due cluster principali che divergevano ad un livello di similarità (S.L.) pari al 55 % (Fig. 1). Il cluster I (S.L.= 79 %) includeva 39 isolati suddivisi in 12 gruppi e 26 tipi AFLP mentre il cluster II (S.L. = 78 %) includeva 24 isolati arrangiati in 10 gruppi e 21 tipi AFLP.
Complessivamente sono stati identificati 45 differenti profili allelici (ST). ST 9 (n=6; 9.5%) e ST 121 (n=4; 6.3%) risultavano essere i profili più comuni (Fig.1).
AFLP e MLST fornivano risultati simili in termini di potere di discriminazione. Il D.I. calcolato per le due tecniche era 0.990 per AFLP e 0.984 per MLST. Questi valori erano sensibilmente più elevati rispetto al D.I. calcolato per la sierotipizzazione (0.743).

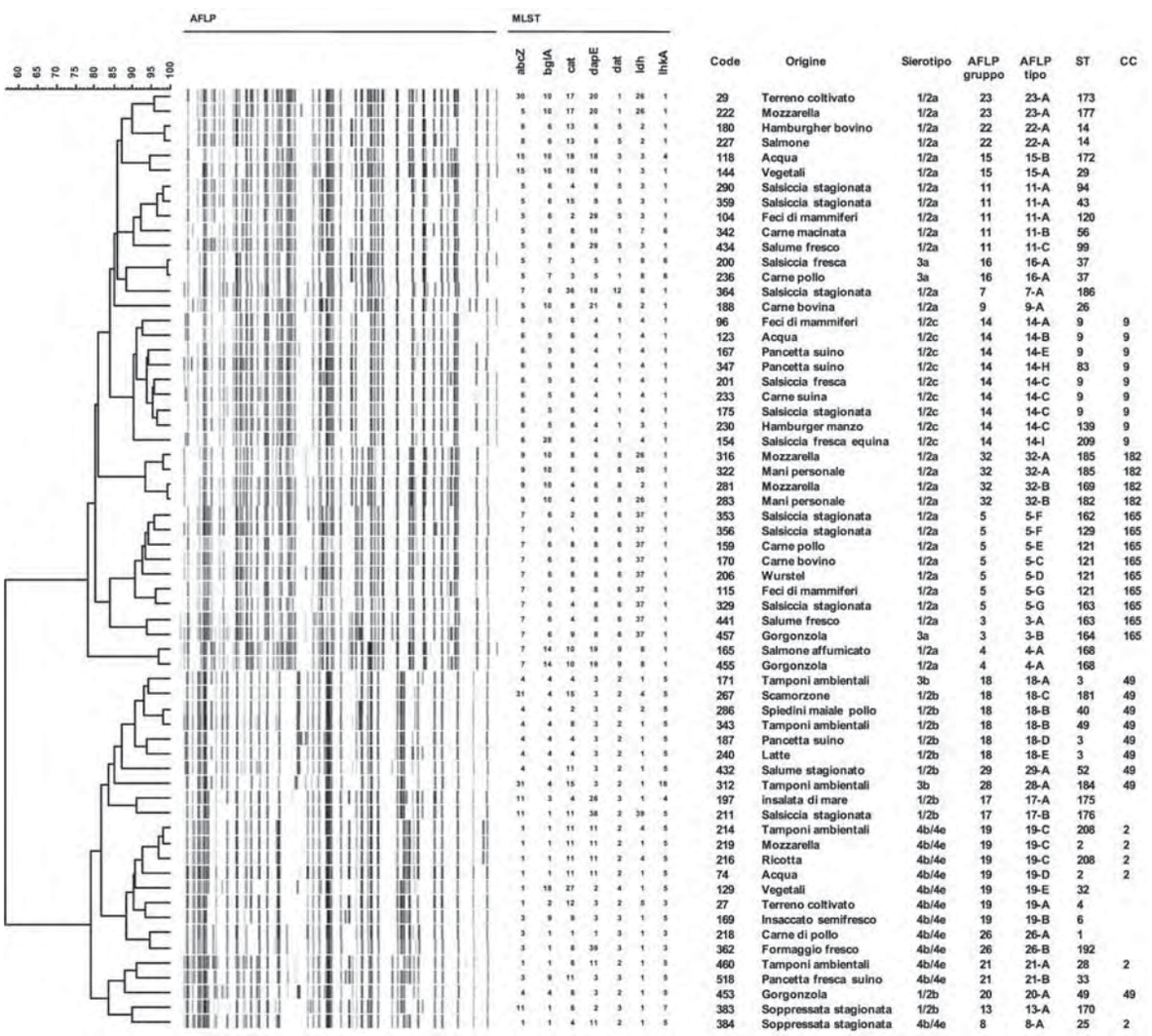
DISCUSSIONE
La caratterizzazione di *L. monocytogenes* è importante per confrontare gli isolati nel corso di episodi di tossinfezione alimentare, o per identificare le fonti di contaminazione e le vie di diffusione all'interno degli stabilimenti di produzione alimentare o ancora per studiare l'epidemiologia del microrganismo nell'ambiente, negli animali e nell'uomo.
Sebbene la sierotipizzazione abbia costituito in passato un importante riferimento, essa è in grado di riconoscere solo 13 diversi sierotipi e di questi, gli isolati 1/2a, 1/2b e 4b/4e rappresentano oltre il 95% degli stipiti isolati da casi di listeriosi nell'uomo o da fonti alimentari. Questo limita fortemente il ricorso a questa tecnica per le indagini epidemiologiche (4). In considerazione di tali esigenze, nel corso degli ultimi anni, si è assistito ad una proliferazione di metodi, prevalentemente basati su tecniche di fingerprinting, per il confronto di isolati clinici ed alimentari di *L. monocytogenes*.
Tra le tecniche di fingerprinting AFLP presenta numerosi vantaggi in termini di riproducibilità e processività. L'uso della elettroforesi capillare eseguita mediante analizzatori genetici, per la precisa determinazione della dimensione dei frammenti, unita a software avanzati per l'analisi dei dati e la comparazione dei profili ottenuti rende questo metodo un prezioso strumento per la caratterizzazione delle popolazioni microbiche.
MLST è divenuto uno dei metodi più popolari per la genotipizzazione batterica. Questa tecnica rappresenta l'evoluzione, basata sulle sequenze del DNA, della Multi-locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) di cui conserva le caratteristiche di fruibilità in studi di epidemiologia globale fornendo in più un maggiore potere di discriminazione ed una maggiore riproducibilità interlaboratorio. Anche se gli schemi MLST sono basati sulle sequenze di sette geni housekeeping essi sono in grado di identificare numerosi profili allelici. Nella nostra ricerca su un totale di 63 isolati di *L. monocytogenes*

sono stati identificati 45 ST e 5 principali Complessi Clonali.
AFLP e MLST mostravano un potere di discriminazione simile, 0.990 e 0.984 rispettivamente, sensibilmente più elevato rispetto alla sierotipizzazione (D.I.=0.743), sottolineando ancora una volta la scarsa efficacia di quest'ultima tecnica ai fini epidemiologici.
Gli isolati 1/2a, 1/2b e 4/b/4e, i sierotipi più frequentemente coinvolti nell'eziologia dei casi umani di listeriosi (4), presentavano la maggiore variabilità genetica. Questo sottolinea la necessità del ricorso a potenti sistemi di tipizzazione genetica nelle indagini epidemiologiche in corso di focolai di tossinfezione o per l'identificazione delle fonti di infezione.
In conclusione, la presente ricerca dimostra che le tecniche di AFLP e MLST rappresentano validi strumenti per lo studio della epidemiologia di *L. monocytogenes*. Il grande vantaggio di MLST, rispetto ad AFLP e agli altri metodi basati su fingerprinting, risiede nella estrema riproducibilità dei dati di sequenza che consentono il confronto dei dati tra laboratori. Un altro grande vantaggio di MLST è costituito da una gestione on-line dei dati che vengono aggiornati da un amministratore globale, il che rende possibile la caratterizzazione degli isolati confrontandoli in sistema sempre attuale ed universale. Malgrado ciò, MLST è una tecnica abbastanza costosa e laboriosa se comparata ad AFLP, che è al contrario economica ed altamente processiva e presenta inoltre il vantaggio di discriminare le diverse specie del genere *Listeria*.
Certamente l'integrazione di questi due sistemi di tipizzazione genetica potranno consentire in futuro di conoscere in maniera sempre più approfondita la epidemiologia di *L. monocytogenes*.

BIBLIOGRAFIA

1. Hunter,P.R. and Gaston,M.A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. Journal of Clinical Microbiology 26, 2465-2466.
2. Parisi,A., Normanno,G., Susca,A., Miccolupo,A., Latorre,L., Lasalandra,G., Quaglia,N.C. and Santagada,G. (2009) Amplified fragment length polymorphism for high-resolution typing of Listeria monocytogenes from foods and the environment. Clinical microbiology and infection 15, suppl 4.
3. Ragon,M., Wirth,T., Hollandt,F., Lavenir,R., Lecuit,M., Le,M.A. and Brisse,S. (2008) A new perspective on Listeria monocytogenes evolution. PLoS. Pathog. 4, e1000146.
4. Schonberg,A., Bannerman,E., Courtieu,A.L., Kiss,R., McLauchlin,J., Shah,S. and Wilhelms,D. (1996) Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of Listeria monocytogenes. International Journal of Food Microbiology 32, 279-287.
5. Ueda,F., Sugamata,M., Aota,M., Mochizuki,M., Yamada,F. and Hondo,R. (2002) Swift and definite serotyping for isolated Listeria monocytogenes strains. New Microbiologica 25, 165-171.

RINGRAZIAMENTI: Si ringraziano per la collaborazione tecnica Giove Brigida, Contò Leopoldo, Tremamunno Cristina.
Questo lavoro è stato supportato dal finanziamento del Ministero della Salute (Ricerca corrente IZSPB006/06)



Code	Origine	Sierotipo	AFLP gruppo	AFLP tipo	ST	CC
29	Terreno coltivato	1/2a	23	23-A	173	
222	Mozzarella	1/2a	23	23-A	177	
180	Hamburgher bovino	1/2a	22	22-A	14	
227	Salmone	1/2a	22	22-A	14	
118	Acqua	1/2a	15	15-B	172	
144	Vegetali	1/2a	15	15-A	29	
290	Salsiccia stagionata	1/2a	11	11-A	94	
359	Salsiccia stagionata	1/2a	11	11-A	43	
104	Feci di mammiferi	1/2a	11	11-A	120	
342	Carne macinata	1/2a	11	11-B	56	
434	Salume fresco	1/2a	11	11-C	99	
200	Salsiccia fresca	3a	16	16-A	37	
236	Carne pollo	3a	16	16-A	37	
364	Salsiccia stagionata	1/2a	7	7-A	186	
188	Carne bovina	1/2a	9	9-A	26	
96	Feci di mammiferi	1/2c	14	14-A	9	9
123	Acqua	1/2c	14	14-B	9	9
167	Pancetta suino	1/2c	14	14-E	9	9
347	Pancetta suino	1/2c	14	14-H	83	9
201	Salsiccia fresca	1/2c	14	14-C	9	9
233	Carne suina	1/2c	14	14-C	9	9
175	Salsiccia stagionata	1/2c	14	14-C	9	9
230	Hamburger manzo	1/2c	14	14-C	139	9
154	Salsiccia fresca equina	1/2c	14	14-I	209	9
316	Mozzarella	1/2a	32	32-A	185	182
322	Mani personale	1/2a	32	32-A	185	182
281	Mozzarella	1/2a	32	32-B	169	182
283	Mani personale	1/2a	32	32-B	182	182
353	Salsiccia stagionata	1/2a	5	5-F	162	165
356	Salsiccia stagionata	1/2a	5	5-F	129	165
159	Carne pollo	1/2a	5	5-E	121	165
170	Carne bovino	1/2a	5	5-C	121	165
206	Wurstel	1/2a	5	5-D	121	165
115	Feci di mammiferi	1/2a	5	5-G	121	165
329	Salsiccia stagionata	1/2a	5	5-G	163	165
441	Salume fresco	1/2a	3	3-A	163	165
457	Gorgonzola	3a	3	3-B	164	165
165	Salmone affumicato	1/2a	4	4-A	168	
455	Gorgonzola	1/2a	4	4-A	168	
171	Tamponi ambientali	3b	18	18-A	3	49
267	Scamorzone	1/2b	18	18-C	181	49
286	Spiedini maiale pollo	1/2b	18	18-B	40	49
343	Tamponi ambientali	1/2b	18	18-B	49	49
187	Pancetta suino	1/2b	18	18-D	3	49
240	Latte	1/2b	18	18-E	3	49
432	Salume stagionato	1/2b	29	29-A	52	49
312	Tamponi ambientali	3b	28	28-A	184	49
197	insalata di mare	1/2b	17	17-A	175	
211	Salsiccia stagionata	1/2b	17	17-B	176	
214	Tamponi ambientali	4b/4e	19	19-C	208	2
219	Mozzarella	4b/4e	19	19-C	2	2
216	Ricotta	4b/4e	19	19-C	208	2
74	Acqua	4b/4e	19	19-D	2	2
129	Vegetali	4b/4e	19	19-E	32	
27	Terreno coltivato	4b/4e	19	19-A	4	
169	Insaccato semifresco	4b/4e	19	19-B	6	
218	Carne di pollo	4b/4e	26	26-A	1	
362	Formaggio fresco	4b/4e	26	26-B	192	
460	Tamponi ambientali	4b/4e	21	21-A	28	2
518	Pancetta fresca suino	4b/4e	21	21-B	33	
453	Gorgonzola	1/2b	20	20-A	49	49
383	Soppressata stagionata	1/2b	13	13-A	170	
384	Soppressata stagionata	4b/4e	8	8-A	25	2

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN DUE CASI CORRELATI DI TOSSIFEZIONE DA ENTEROTOSSINA STAFILOCOCCICA IN FORMAGGIO

[1]Gallina S., [1]Bianchi D.M., [2]Caroli D., [3] Cesari L., [3] Cimieri C., [1]Civalleri N., [1]Fabbri M., [1]Corvonato M., [1]Decastelli L.
[1]NRL per gli Stafilococchi coagulasi positivi compreso S. aureus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; [2]ARPA Piemonte; [3]Azienda Sanitaria Locale TO 3, Regione Piemonte

Key words: *S.aureus, MTA, enterotosine stafiloccocciche*

SUMMARY
During August 2008 two foodborne outbreaks, caused by staphylococcal enterotoxins, apparently not correlated, have been reported in Piedmont Region. In total 24 people have been involved and for 13 of them the hospitalization was necessary. Food samples have been analyzed using RPLA, ELISA and ELFA methods. Molecular assays have also been used according to the Community Reference Laboratory (CRL) for Coagulase Positive Staphylococci including *S.aureus.* The aim of this report is to expose how the analyses have been conducted and how the case has been resolved.

INTRODUZIONE
Molti ceppi di *S. aureus* e di altri stafilococchi coagulasi positivi, come *S. intermedius* e *S. hyicus*, sono in grado di produrre esotossine termoresistenti (enterotossine stafilococciche, SE), in grado di resistere a temperature molto elevate (1 ora a 100°C) e al trattamento con proteasi; tali enterotossine (SE) sono frequentemente legate ad episodi tossinfettivi di origine alimentare.
A tutt'oggi sono stati identificate numerose SE; nonostante ciò, la maggior parte degli episodi di intossicazione alimentare è correlata alla presenza delle tossine A e/o D. La sintomatologia compare rapidamente dopo un breve periodo di incubazione (1-6 ore) e si manifesta con nausea, vomito e diarrea.
Le SE, all'interno della normativa europea in ambito di sicurezza alimentare (Regolamento CE 2073/05, modificato dal Reg. CE 1441/07) sono incluse tra i criteri di sicurezza alimentare insieme con i più comuni agenti patogeni (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *E.coli*). Gli stafilococchi coagulasi positivi, invece, sono inclusi tra i criteri di igiene che definiscono il funzionamento del processo di produzione.
Il presente lavoro descrive due casi di intossicazione da enterotossina stafilococcica legata al consumo di produzioni lattiero casearie d'alpeggio: i due epiodi, verificatisi a distanza di oltre 15 giorni, sono risultati essere correlati tra loro. Viene inoltre presentata l'indagine epidemiologica svolta in collaborazione tra i servizi SIAN, i Laboratori dell'ARPA e dell'IZS e che ha portato alla conferma di correlazione tra i due episodi tossinfettivi e all'identificazione dell'alimento incriminato e dell'agente responsabile della sintomatologia.

MATERIALI E METODI
Il giorno 4 agosto del 2008, si è svolto in località Novalesa (TO), piccolo comune in Val Cenischia, ai piedi del Colle del Moncenisio, un pranzo tra amici in una tipica baita di montagna. Al pranzo avevano partecipato 22 persone tra cui interi nuclei familiari con minori, famiglie di adulti, tutti amici o conoscenti. A poche ore dal pasto è stato necessario l'intervento dell'elisoccorso per il recupero di 12 persone che accusavano sintomi gastroenterici. Il ricorso all'elisoccorso tuttavia è giustificato più che dalla gravità dei sintomi manifestati, dalla difficoltà nel raggiungere la baita (l'ultimo tratto di strada è percorribile solo da mezzi attrezzati per il fuori-strada) e dal numero delle persone sintomatiche. Delle 12 persone trasportate a valle, 8 sono visitate presso il Pronto Soccorso di Susa (TO) e 4 presso il DEA di Rivoli (TO). I pazienti riferiscono i seguenti sintomi: vomito, diarrea, febbre a 38 °C per 2 bambine di 2 e 4 anni, dolori di stomaco per uno dei pazienti.
La sintomatologia, insorta dalle 2 alle 4 ore dall'ingestione del pasto, si è risolta nell'arco di alcune ore per tutti i pazienti, i quali sono tutti dimessi in serata.
L'indagine epidemiologica raccoglie il menu del pranzo che è riportato in tabella 1

Tabella 1: Menu del pranzo incriminato

Salame suino
Toma d'alpeggio preparata dai proprietari della baita
Costine e salsiccia di suino alla brace
Insalata mista preparata in loco
Pane preparato in casa da un partecipante
Crostate alla frutta
Anguria
Vino in bottiglia
Acqua di fonte

Vengono prelevati e consegnati al laboratorio di Microbiologia di ARPA Piemonte, sede di Grugliasco, (per l'esecuzione delle analisi riportate in tabella 2) i seguenti campioni:
Campione 1: Formaggio tipo Toma
Campione 2: Acqua di fonte
Campione 3: Carne mista arrostita
Campione 4: Crostata di frutta

Tabella 2: Indagini di laboratorio e metodi applicati sui campioni di alimento (1-4)

ANALISI	**METODO**
Coliformi	ISO 4832:2006
Escherichia coli	ISO 16649-2:2001
Stafilococchi coagulasi positivi	ISO 6888-1:2004
Salmonella spp	ISO 6579:2004
Listeria monocytogenes	ISO 11290-1:2005
Enterotossine stafilococciche	KIT RPLA

Il giorno 21 agosto 2008 viene segnalato un ulteriore caso di sospetta MTA in una paziente adulta, che manifesta vomito violento e ripetuto a partire da 2 ore circa dall'ingestione del pasto serale. La donna è ricoverata all'ospedale di Pinerolo (TO), trattenuta per le cure del caso e dimessa la mattina seguente. Dopo attenta indagine epidemiologica la paziente risulta essere madre di uno dei partecipanti al pranzo del 4 agosto che, in occasione della giornata in baita aveva acquistato una porzione di Toma, consegnata alla madre solo in data 20 agosto. I resti della Toma consumata dalla paziente (Campione 5) sono stati prelevati e consegnati al Laboratorio Controllo Alimenti dell'IZS PLV. Il campione 5 è sottoposto alle prove indicate in tabella 3

Tabella 3: Indagini di laboratorio e metodi applicati su campioni di alimento (5)

ANALISI	METODO
Escherichia coli	UNI 10980/2002
Bacillus cereus	NF XP V 08-058/1995
Coliformi	NF V08-050/1999
Enterobatteri	NF V08-054/1999
Stafilococchi coag. positivi	NF V08-057-2/2004
Tossina Bacillus cereus	ELISA (metodo interno)
Listeria monocytogenes	ISO 11290-1:2005
Yesinia enterocolitica	ISO10273/2003
Campylobacter	ISO 10272-1/2006
E.coli O157	AFNOR BIO12/8-07/00
Salmonella spp	ISO 6579:2004
Enterotossine stafilococciche (Reg1441/2007)	ELISA Transia Diffchamb (2) VIDAS SETII Biomerieux (2)
Identificazione di Enterotossine stafilococciche	ELISA ID Transia Diffchamb

Inoltre sui ceppi di *S. aureus* isolati sono state eseguite analisi di biologia molecolare per consentire l'individuazione dei geni *23S* rRNA (specifico per *S. aureus*) (3), *SEA* (enterotossina A) (3), *SEB* (enterotossina B) (3), *SEC* (enterotossina C) (3), *SED* (enterotossina D) (3), *SEE* (enterotossina E) (3), *SEG* (enterotossina G) (3), *SEH* (enterotossina H) (3), *SEI* (enterotossina I) (3), *SEJ* (enterotossina J) e *NUC* (termonulceasi) (4).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nessun microrganismo patogeno è stato isolato dai campioni.

Tuttavia, i risultati delle analisi microbiologiche effettuati sui campioni di alimenti hanno fatto rilevare alte cariche di microrganismi indicatori di igiene (10^4-10^5 ufc/g): tali dati sono da considerare anche in relazione al momento e alle modalità di prelievo di tali alimenti. Essi infatti sono i resti dei pasti consumati e verosimilmente sono stati esposti a condizioni igieniche precarie (esposizione sul tavolo per la durata del pasto) e con un'interruzione prolungata della catena del freddo.

Inoltre, i campioni 1 e 5 hanno mostrato valori di Stafilococchi coagulasi postivi (CPS) rispettivamente di $9{,}9x10^5$ ufc/g e $>10^5$ ufc/g. Il campione 1 è risultato negativo alla ricerca di enterotossina stafilococcica con metodo RPLA, mentre il ceppo di *S. aureus* isolato dalla matrice (ceppo 1) è risultato essere produttore di enterotossina A e D. Il campione 5, è risultato positivo per la ricerca di enterotossine stafilococciche. Inoltre, mediante il metodo Transia ID le tossine riscontrate sono risultate essere del tipo A e D. Il ceppo di *S. aureus* isolato da tale campione (ceppo 5) sottoposto a prove di biologia molecolare ha evidenziato la presenza dei geni *SEA* (fig. 1) e *SED* (fig. 2).

Figura 1: gene SEA

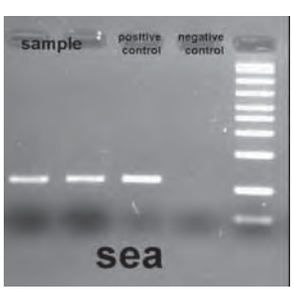


Figura 2: gene SED

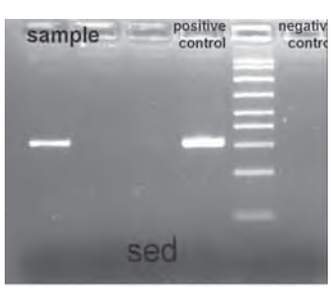


Tabella 4: esiti analiti

I risultati generali delle analisi eseguire sui campioni 1 e 5 e sui ceppi 1 e 5 sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4: esiti analitici

	Alimento 1	Ceppo 1	Alimento 5	Ceppo 5
CPS ufc/g	$9{,}9x10^5$	-	$>10^5$	-
RPLA	NEG	A e D	-	-
ELISA/VIDAS	-	-	POS	POS
TRANSIA ID	-	A e D	A e D	A e D
***23S* rRNA**	-	-	-	POS
SEA	-	-	-	POS
SEB	-	-	-	NEG
SEC	-	-	-	NEG
SED	-	-	-	POS
SEE	-	-	-	NEG
SEH	-	-	-	NEG
SEI	-	-	-	NEG
SEJ	-	-	-	POS
NUC	-	-	-	POS

L'analisi epidemiologica, supportata dai dati ottenuti che evidenziano nei due campioni le stesse enterotossine, consentono di affermare che i due episodi hanno origine comune e che fanno parte, quindi, del medesimo episodio tossinfettivo.

Dall'analisi dei dati, inoltre, appare evidente come i test ELISA e TRANSIA si dimostrino maggiormente sensibili rispetto al kit RPLA riuscendo a mettere in evidenza la positività per enterotossine direttamente nell'alimento e non solo nel ceppo.

I dati delle ricerche biomolecolari, inoltre, confermano quanto evidenziato con il kit ELISA Transia ID per l'identificazione delle differenti enterotossine. Le analisi biomolecolari, però, consentono delle considerazioni supplementari in quanto in grado di evidenziare enterotossine non contemplate nei kit ELISA; in particolare la presenza del gene codificante la enterotossina J è un dato particolarmente significativo e che concorda con le indicazioni del CRL che riportano l'enterotossina J come tossina emergente nei recenti casi di tossinfezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento CE 1441/2007
2. Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk & milk products and other food matrices – European screening method of the CRL "Coagulase positive Staphylococci, including Staphylococcus aureus" – Version 2, 01/04/08
3. Kerouanton, A., J.A. Hennekinne, C. Letertre, et al. 2007. Characterization of Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France. Int J Food Microbiol. 115:369-375
4. Cremonesi P., Luzzana M., Brasca M., Morandi S., Lodi R., Vimercati C., Agnellini D., Caramenti G., Moroni P., Castiglioni B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19;299-305

PESTI SUINE: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

Domenico Rutili

La peste suina classica (PSC) e la peste suina africana (PSA) sono state "insignite" nel tempo con varie ed appropriate definizioni, che tutte riflettono per entrambi l'elevato potenziale di rischio di introduzione/diffusione e i gravi danni che da ciò ne possono derivare. L'elevata contagiosità e quindi la rapida diffusibilità delle due malattie hanno imposto la loro inclusione nel gruppo delle cosiddette *Transboundary Animal Diseases (TAD) and Emerging Diseases*, in accordo con le linee guida dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità Animale (OIE). PSC e PSA rappresentano ancora una minaccia costante sia per i Paesi ad elevato sviluppo della suinicoltura che per i Paesi dove l'allevamento suino costituisce l'unica o una delle poche fonti di sussistenza per la popolazione. I consistenti danni economici indotti dalle due malattie originano per gli uni dal blocco delle esportazioni di animali, carni e prodotti trasformati mentre per gli altri dalle perdite dirette dovute agli elevati tassi di mortalità che si riscontrano nelle popolazioni suine e quindi ad una drastica riduzione delle risorse alimentari destinate all'uomo.

Le strategie di controllo ed eradicazione messe in atto dai Paesi interessati contribuiscono in notevole misura ad incrementare l'impatto economico generato dalle due malattie. Le campagne di profilassi vaccinale attuate dai Paesi che registrano ancora le presenza della PSC incidono anch'esse, direttamente o indirettamente con riflessi sulle attività commerciali, sui costi sostenuti per il controllo della malattia.

L'obbiettivo di prevenire l'introduzione e la diffusione di PSC e PSA tra le popolazioni di suidi delle diverse regioni del mondo e le relative conseguenze economiche ha determinato l'instaurarsi di forti interessi e necessità di approfondire le conoscenze sui diversi aspetti delle due malattie e di valutare costantemente le relative caratteristiche epidemiologiche.

La PSC, caratterizzata nel passato da una diffusione quasi cosmopolita, è stata eradicata in molti Paesi. Ciononostante i sistemi di allevamento intensivo del suino, la rapidità di movimentazione degli animali e la globalizzazione dei commerci rendono sempre attuale il rischio di reintroduzione dell'infezione, poiché numerosi sono i paesi dove la malattia viene ancora segnalata. Infatti stando ai dati derivanti dal sistema di notifica dell'OIE, la PSC è stata riportata nel 2008 in **Europa** (Russia, Romania, Montenegro e Slovakia), in **Africa** (Madagascar), in **Asia** (Nepal, Cina, Tailandia, Filippine, India, Laos, Vietnam, Singapore Malaysia e Srilanka) e nelle **Americhe** (Equador, Perù, Nicaragua, Bolivia, Brasile e Caraibi). Nel primo semestre del 2009 la PSC è stata riportata anche in **Brasile** e **Israele**.

La PSA ha mantenuto nel tempo il suo stato di endemicità in **Africa**, in particolare nella parte sub-sahariana del continente africano ad eccezione di pochi paesi dove la malattia è stata eradicata nel suino domestico e di altri dai quali non si hanno informazioni. In Europa la malattia, dopo essere stata eradicata nella Penisola Iberica, rimane endemica in **Sardegna**. Recentemente la PSA è stata introdotta in alcuni Paesi dell'**Area Caucasica** (Georgia, Armenia, Repubblica di Cecenia, Azerbaijan, Nord Ossezia, Dagestan, Kabardino Balkaria) ed in **Russia**.

Per quanto attiene alla PSC possiamo evidenziare elementi di attualità soprattutto relativi al capitolo della situazione epidemiologica nel cinghiale e dei vaccini. Il cinghiale rappresenta un reservoir storico per il virus della PSC. Negli ultimi 5 anni sono state colpite le popolazioni di cinghiali di Germania, Francia, Lussemburgo, Belgio, Slovacchia, Romania, Bulgaria, Russia ed alcuni Paesi dell'area dei Balcani. La maggior parte dei focolai primari nel suino domestico sono stati correlati alla situazione endemica della PSC nelle popolazioni di cinghiali. Le modalità di introduzione e di persistenza dell'infezione nell'ambito delle popolazioni di selvatici costituiscono aspetti epidemiologici di grosso interesse poiché unitamente agli aspetti riguardanti la dinamica delle popolazioni stesse, consentono l'elaborazione di piani di intervento per il controllo della malattia. Negli ultimi anni alcuni Paesi hanno fatto ricorso alla vaccinazione *per os* a seguito dell'introduzione della malattia in alcune regioni ma tale misura di controllo a fronte di un forte impegno organizzativo ed economico, non ha consentito di combattere efficacemente la PSC nel cinghiale che ha assunto nella maggior parte dei casi un andamento endemico. Il vaccino (ceppo cinese attenuato) impiegato non permette inoltre la distinzione tra animali vaccinati e infetti con l'impiego degli attuali metodi di laboratorio impiegati nel corso di programmi di sorveglianza sierologica. Procedure molecolari recentemente sviluppate consentono tuttavia di differenziare genotipi vaccinali da genotipi virali di campo. Attualmente è in corso in Germania, come misura collaterale alla vaccinazione, un programma basato sul decremento della popolazione del suino domestico nelle aree a maggior incidenza della malattia nel cinghiale.

La presenza in un territorio di PSC nel cinghiale comporta sostanzialmente le stesse conseguenze, dal punto di vista commerciale, derivanti dalla presenza dell'infezione nel suino domestico. Inoltre alcune esperienze in Germania ed in Francia hanno dimostrato il rischio della recrudescenza dell'infezione in certe aree a seguito di evidenti miglioramenti epidemiologici conseguiti con la vaccinazione che lasciavano prevedere il raggiungimento dell'eradicazione.

Senza dubbio il settore nel quale sono stati registrati gli sviluppi più interessanti è quello dei vaccini. Dopo lo scarso successo dei vaccini *marker* a sub-unità virali basati su proteine ricombinanti, nel corso degli ultimi anni l'impiego dell'ingegneria genetica ha permesso lo sviluppo di vaccini innovativi di tipologie diverse ma con la capacità di replicare e la caratteristica comune di possedere uno o più *marker* antigenici.

1. <u>Vaccini costituiti da virus mutanti con delezioni o inserti</u>. Autori americani hanno recentemente sviluppato un vaccino sperimentale basato su uno stipite vivo attenuato (LAV) del virus della PSC nel quale è stato inserito un epitopo sintetico (Flag) a livello della glicoproteina E1, che funge da *marker* positivo, e contemporaneamente hanno allontanato un epitopo altamente conservato e specifico per la glicoproteina E2 (WH303) del virus PSC (PSCV), che funge da *marker* negativo. L'immunizzazione intranasale con questo vaccino induce una protezione completa di animali sottoposti a challenge con stipite altamente virulento già a partire dal 3° giorno dopo la somministrazione. La protezione si manifesta già dopo due giorni se l'inoculazione avviene per via intramuscolare. La risposta anticorpale nei confronti del *marker* positivo e la negatività sierologica nei confronti del *marker* WH303 permetteranno la differenziazione tra suini vaccinati e suini infetti con virus di campo.

2. <u>Vaccini costituiti da virus chimere</u>. Ricercatori olandesi hanno sviluppato un vaccino

marker costituito da uno stipite attenuato del virus della PSC. Su cloni infettanti di uno stipite C sono stati sostituiti la regione antigenica della glicoproteina dell'envelope E2 e/o l'intero gene della glicoproteina E^{rns} con sequenze omologhe di uno stipite di BVDV II. Entrambi i virus chimerici hanno indotto la formazione di anticorpi nei confronti delle due determinanti antigeniche che potevano essere discriminati da quelli indotti dal virus di campo. Inoltre i risultati di indagini preliminari di challenge con ceppi virulenti di PSCV hanno mostrato una buona protezione clinica ad 1 e 2 settimane dopo la vaccinazione.

Ricercatori tedeschi hanno invece sviluppato un *pestivirus* chimerico (CP7-E2alf) utilizzando uno stipite BVDV nel quale le sequenze codificanti per la proteina maggioritaria dell'envelope (E2) sono state rimpiazzate con quelle omologhe dello stipite Alfort 187 della PSC. Il prodotto risultante ha mostrato di essere completamente virulento ed in grado di indurre anticorpi PSCV-E2 specifici e anticorpi neutralizzanti nei confronti di PSCV a seguito di somministrazione *per os* nel suino e nel cinghiale. L'utilizzo di metodi ELISA marker PSCV-specifici (E^{rns}) e di prove di genotipizzazione permetteranno di differenziare gli animali vaccinati da quelli infetti.

Il costante interesse mostrato a livello internazionale nel salvaguardare le popolazioni di suini domestici e selvatici dall' introduzione della PSC o nell'individuare strategie efficaci di controllo, è verosimile immaginare prospettive di ulteriore sviluppo tecnico-scientifico che potranno riguardare soprattutto l'agente eziologico e la diagnosi o scenari mutati relativamente alle strategie di controllo. Alcuni gruppi di ricercatori stanno affrontando il difficile compito di approfondire le conoscenze relative ai *marker* di virulenza del virus della PSC. La genomica darà un contributo determinante per la individuazione delle regioni del genoma virale responsabili della codifica di proteine coinvolte nel determinismo del livello di virulenza dei diversi stipiti. La diagnosi di laboratorio di PSC si avvale di diverse procedure dotate di parametri di efficacia notevoli ma in futuro ci si attende il miglioramento del grado di ripetibilità e di semplicità dal momento che il livello di sensibilità è già soddisfacente.

Probabilmente le prospettive di maggior interesse riguardano la ridefinizione delle strategie di controllo della PSC. Motivazioni di ordine etico ed economico sono alla base di una forte esigenza di evitare in futuro, almeno nell'ambito dei Paesi dell'UE, l'abbattimento e la distruzione di un numero di animali così elevato da compromettere la continuità produttiva dell'intero comparto suinicolo di un Paese come accaduto nelle epidemie olandese e tedesca verificatesi alla fine degli anni '90. Lo sviluppo recente di vaccini innovativi realizzati con l'ausilio della ingegneria genetica, determinerà, qualora i risultati di *trials* di campo dovessero confermare quelli preliminari, l'affermazione di un *paradigma shift* nel controllo della malattia. Infatti questi vaccini, allestiti con virus chimerici in grado di replicare nell'ospite target, rispondono ai criteri della tecnologia DIVA. Tali caratteristiche permetteranno di rendere la vaccinazione complementare alla misura dello *stamping out* fino ad oggi considerata basilare nell'eradicazione dei focolai di PSC. Per di più i risultati di uno studio recente condotto da esperti dell'Agenzia EFSA sul rischio di presenza di virus di campo in carni di suini provenienti da allevamenti vaccinati, hanno portato alla conclusione che strategie basate su appropriati piani di vaccinazione d'emergenza unitamente a ricerche mirate di eventuali animali cronicamente infetti negli allevamenti vaccinati, causerebbero rischi inferiori alla strategia della non vaccinazione.

Le caratteristiche e la complessità molecolare del virus della PSA, che anche dal punto di vista tassonomico costituisce un esemplare unico per famiglia (Asfiviridae) e genere (Asfivirus), hanno determinato uno sviluppo delle relative conoscenze più modesto rispetto al virus della PSC. I più interessanti elementi di attualità che riguardano il virus della PSA e le malattia che questo causa possono essere riscontrati nel settore della diagnosi e nei diversi tentativi di sviluppare un vaccino che a tutt'oggi non è ancora disponibile.

La gravità della malattia e la rapidità con cui essa si diffonde, ha fatto si che si ponesse grande attenzione alla messa a punto di procedure diagnostiche sensibili e in grado di fornire i risultati in breve tempo. Ricercatori spagnoli hanno sviluppato una rtPCR in grado di rilevare tracce di genoma virale nel periodo preclinico, 2-4 giorni prima delle manifestazioni cliniche. La tecnologia usata consente di considerare tale prova un *pen-side test* e può trovare impiego per attività di sorveglianza in aree libere o di monitoraggio in corso di focolaio in tempo reale. E' da ritenere inoltre molto utile disporre di prove semplici e rapide da realizzare a livello di allevamento soprattutto per superare le difficoltà dei laboratori diagnostici in paesi non in grado di affrontare emergenze sanitarie, come accaduto recentemente in alcuni paesi a nord del Caucaso.

Alcune ricerche in corso per lo sviluppo di vaccini si basano sull'osservazione che alcuni stipiti del virus della PSA a bassa virulenza proteggono il suino dal challenge con stipiti virulenti strettamente correlati e i target immunologici ed i meccanismi coinvolti in questi modelli di protezione vengono usati per la messa a punto di un vaccino in grado di prevenire la malattia. Una strategia è rappresentata dalla creazione di virus PSA attenuati attraverso la delezione di sequenze geniche conosciute per essere coinvolte nello sfuggire al sistema immunitario dell'ospite, di geni connessi alla virulenza e geni deputati alla replicazione negli insetti vettori o nei macrofagi suini su stipiti virulenti. Verifiche intermedie sul potenziale vaccino dovranno assicurare che una immunità sufficiente alla protezione dall'infezione e dalla malattia venga mantenuta. Ulteriori ricerche tendono a chiarire il controverso ruolo degli anticorpi neutralizzanti nei confronti di alcune proteine maggioritarie del virus della PSA (p30, p54 e p72) nell'influenzare in maniera significativa o meno il manifestarsi della malattia. Gli stessi autori al fine di approfondire tali aspetti ed utilizzando la tecnologia dei virus ricombinanti hanno inserito le sequenze di queste proteine nel genoma del virus di Aujeszky che oltre al vantaggio di essere espresso a livello intracellulare è in grado di stimolare le classi di linfociti (CD4-CD8/T e B) responsabili della risposta immunitaria.

E' verosimile immaginare che i progressi che in futuro, più o meno vicino, potranno essere registrati nelle conoscenze della PSA riguarderanno prevalentemente il suo agente causale ed il controllo della malattia. L'approfondimento del ruolo delle diverse componenti antigeniche nel meccanismo patogenetico della malattia offrirà vantaggi concreti sia per l'ampliamento del novero delle procedure diagnostiche sia per una migliore conoscenza dei meccanismi che sono alla base dell'attivazione del sistema immunoprotettivo del suino.

Comunque i progressi scientifici tendenti a sviluppare validi presidi immunizzanti non possono e non devono incrinare l'importanza e la necessità di ricorrere alle convenzionali misure di prevenzione e controllo della malattia che non esauriranno mai la loro attualità. Le caratteristiche epidemiologiche della PSA e di altre importanti TAD hanno dimostrato, soprattutto negli ultimi 30 anni di esperienza, che anche le strategie più drastiche e prive di alternative, risultano spesso inefficaci per raggiungere la loro eradicazione. L'espansione dell'area di distribuzione della PSA dall'inizio degli anni '90 ha rimarcato la capacità da parte del suo agente causale di attraversare lunghe distanze in breve tempo come dimostrato dall'introduzione di un genotipo africano nella Repubblica di Georgia nel 2007. Durante lo stesso periodo, i focolai riportati nelle nuove aree, compreso il Continente Africano, sono risultati associati alla movimentazione di suini o di prodotti derivati piuttosto che al contatto con suidi selvatici che hanno storicamente rappresentato il serbatoi naturale del virus.

Le Autorità Veterinarie dovranno pertanto prendere atto che, al di là della disponibilità di efficaci e specifiche normative, dovranno essere attuati piani di intervento e promosse iniziative tendenti a convincere tutte le diverse categorie di produttori suinicoli che l'arresto della diffusione della PSA potrà concretamente realizzarsi solo quando essi stessi avranno piena consapevolezza dei fattori di rischio legati alla diffusione del virus e della necessità di applicare tutte le precauzioni possibili per la difesa degli allevamenti.

In buona sostanza, occorrerà creare o rafforzare la convinzione che le norme di biosicurezza rappresentano la pietra angolare di un sistema di protezione degli animali dalla PSA e da tutte le più pericolose malattie che generano emergenze sanitarie e che minacciano il patrimonio suinicolo di ogni Paese.

NB. La bibliografia è disponibile presso l'autore

VIRUS INFLUENZALI SUINI H1N2 IN ITALIA: PRESENZA DI CEPPI RIASSORTANTI

Moreno A., Barbieri I., Sozzi E., Lelli D., Fontana R., Alborali L., Cordioli P.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia

Key words: influenza suina, sottotipo H1N2, caratterizzazione molecolare

SUMMARY
The molecular characterization of H1N2 swine influenza virus isolated in Italy in the last ten years are reported. The phylogenetic analysis were performed by the complete sequencing of HA and NA genes. Genetic and phylogenetic analysis showed that Italian strains isolated in 2005-2009 were reassortant strains carrying the HA closely related to European H1N2 swine influenza viruses and the NA to the H3N2 human influenza virus circulating in 1997-2008.

INTRODUZIONE

I virus influenzali tipo A sono diffusi in molte specie animali tra cui volatili, suini ed uomo. Nel suino sono diffusi tre sottotipi H1N1, H3N2 ed H1N2. Il sottotipo H1N2, isolato per la prima volta in Gran Bretagna nel 1994 e successivamente in Italia nel 1998, deriva dal riassortamento genetico tra tre differenti virus influenzali. Possiede infatti la emoagglutinina di un virus H1N1 umano circolante nei primi anni 80, la neuraminidasi di un virus H3N2 di origine umana ed i sei geni interni dei virus H1N1 e H3N2 europei di origine aviare (1). Lo scambio di geni virali tra diversi virus influenzali attraverso fenomeni di riassortamento è un evento frequentemente riportato nella specie suina. In questa specie è stata infatti dimostrata la presenza di recettori NeuAc 2,3 Gal e 2,6 Gal caratteristici di virus influenzali aviari ed umani. Per questo motivo, è stato ipotizzato il ruolo del suino come mixing vessel e, recentemente, è stato identificato come reservoir di virus con potenziale pandemico (7). Lo scopo del presente lavoro riguarda la caratterizzazione molecolare dei ceppi H1N2 isolati in Italia dal 1998 al 2009 attraverso il sequenziamento dei geni della emoagglutinina (HA) e della neuraminidasi (HA) ed il confronto con le sequenze di ceppi influenzali suini, umani ed aviari presenti in banca dati. L'analisi filogenetica è stata eseguita allo scopo di verificare le relazioni genetiche fra virus influenzali appartenenti allo stesso sottotipo o a sottotipi differenti, per meglio comprendere l'importanza della continua evoluzione e la comparsa di possibili fenomeni riassortanti.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo compreso tra il 1998 ed il 2009, sono state eseguite indagini virologiche su campioni di polmoni di suini, con sintomi clinici e lesioni anatomopatologiche riferibili a malattia respiratoria acuta.

Virus

Gli estratti originali sono stati analizzati per influenza aviare tipo A tramite real time RT-PCR impiegando primer specifici per il gene della matrice (M) come descritto da Spackman (6). I campioni risultati positivi sono stati inoculati su uova embrionate di pollo di 9-11 giorni di età e su monostrato confluente di linee cellulari MDCK per l'isolamento e la successiva tipizzazione dei virus. Il sovranatante raccolto dopo effetto citopatico completo ed il liquido allantoideo sono stati in seguito analizzati con una metodica Mab-based antigen detection ELISA che utilizza un anticorpo monoclonale specifico per la nucleoproteina tipo A (NPA) e con il test dell'emoagglutinazione (HA). Il sottotipo virale dei ceppi isolati è stato infine ottenuto con l'utilizzo di due multiplex RT-PCR per la determinazione della H e della N (2).

Sequenziamento ed analisi filogenetica

La caratterizzazione molecolare dei ceppi H1N2 è stata eseguita attraverso il sequenziamento parziale dei geni HA (subunità HA1) e NA (792 bp). Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, mediante il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 4.0 utilizzando il metodo massima parsimonia (7). Allo scopo di approfondire l'analisi filogenetica, è stato eseguito il sequenziamento completo dei geni HA e NA dei ceppi H1N2 isolati recentemente nel periodo 2005-2009 utilizzando i primer e la metodica descritta da Hoffman et al (3).

RISULTATI

Nel periodo 1998-2009 sono stati isolati e tipizzati 179 virus influenzali di cui 22 sono risultati H1N2. Dodici ceppi H1N2, i cui dati sono riportati nella tabella n.1, sono stati ulteriormente caratterizzati molecolarmente tramite sequenziamento dei geni HA e NA.

L'albero filogenetico delle sequenze del gene HA ha evidenziato che i ceppi H1N2 formano un cluster chiaramente distinguibile dai ceppi H1N1 derivato dai ceppi umani H1N1 circolanti negli anni '80. I ceppi isolati in Italia negli anni 1998-2003 presentano un'elevata omologia con i ceppi H1N2 contemporaneamente isolati nel Nord di Europa ed anche con ceppi isolati in Germania recentemente negli anni 2004-2007. Un gruppo distinguibile dai ceppi precedentemente descritti è invece formato da ceppi Italiani recenti (2005-2009) che, come evidenzato nell'albero filogenetico, formano un cluster separato. E' da sottolineare anche la presenza di un ceppo riassortante H1N1 isolato nel 2001 la cui HA presenta un'elevata percentuale di omologia con i ceppi H1N2 circolanti in quel periodo (fig. 1).

L'analisi delle sequenze del gene NA ha dimostrato che i ceppi H1N2 isolati in Italia negli anni '98-2001sono altamente correlati con il ceppo capostipite H1N2 Scot/410440/94 e con tutti gli altri ceppi H1N2 isolati in Europa dal '98 fino al 2007. Un dato molto interessante riguarda i nuovi ceppi isolati in Italia negli anni 2005-2009 che presentano una N2 chiaramente distinta dai ceppi H1N2 suini europei. Detti ceppi infatti clusterizzano con i ceppi H3N2 umani isolati negli anni 1997-2008. La maggiore percentuale di omologia si presenta con un ceppo umano A/HK/CUHK20199/97 isolato nel 1997 (da 95,4 a 97,3%). La percentuale di omologia rispetto al ceppo di riferimento H1N2 Sw/It/1521/98 risulta inferiore (dal 85,4 al 87,0%). In questo cluster si trovano anche dei ceppi H1N2 suini isolati recentemente in Hong Kong che comunque sono inseriti in un gruppo ben differenziato dai ceppi italiani (fig. 2).

L'analisi filogenetica derivata dal sequenziamento totale dei geni HA e NA ha confermato quanto osservato dal sequenziamento parziale. I ceppi sequenziati hanno presentato una percentuale di omologia del 93-94% rispetto al ceppo di riferimento Sw/It/1521/98 per il gene HA e del 95% rispetto al ceppo A/HK/CUHK20199/97 per il gene NA.

DISCUSSIONE

Il sottotipo H1N2 è stato l'ultimo sottotipo a stabilirsi nella popolazione suina europea ed in particolare in Italia dal 1998. Negli ultimi 10 anni, la loro frequenza è incrementata in tutto il continente rimanendo tuttavia inferiore alle percentuali di

isolamento dei sottotipi H1N1 e H3N2. Studi evolutivi recenti condotti sui ceppi suini H1N2 europei (4) hanno ipotizzato che il genotipo H1N2 in Europa si sarebbe formato a partire da un ceppo precursore dotato di una NA di derivazione umana. Questo precursore avrebbe incorporato in seguito la HA da ceppi H1N1 umani negli anni 1976-84. Sembrerebbe quindi che i ceppi precursori H1N2 abbiano circolato nel territorio europeo per alcuni anni prima della identificazione del primo isolato nel 1994 (Sw/Scot/410440/94). Multipli fenomeni di riassortamento sono stati ipotizzati nella evoluzione di questi virus. In particolare è stata segnalata la comparsa di un ceppo riassortante Sw/It/2064/99 H1N2, la cui HA deriva dai ceppi suini H1N1 (5). Un altro ceppo riassortante tra i ceppi suini H1N1 ed H1N2 circolanti è il ceppo Sw/It/5433/01 H1N1 che presenta una HA proveniente dai ceppi H1N2. Questi eventi confermano la frequenza di fenomeni di riassortamento tra ceppi suini dei diversi sottotipi tuttavia questi nuovi ceppi riassortanti non sembrano essere completamente adattati in quanto non si sono diffusi nella popolazione suina. Notevole interesse riveste l'evidenziazione dei ceppi italiani H1N2 recentemente isolati che dovrebbero derivare da un reassortimento tra i ceppi H1N2 suini ed i ceppi H3N2 umani. Infatti tutti i ceppi H1N2 isolati in Italia dal 2005 al 2009 possiedono la HA dei ceppi H1N2 suini ma la NA proveniente dai ceppi umani H3N2. A differenza dei ceppi riassortanti evidenziati precedentemente, questi nuovi ceppi sembrerebbero essere maggiormente adattati alla popolazione suina e rappresentano la totalità dei ceppi H1N2 isolati in questi ultimi anni. Un ulteriore approfondimento delle caratteristiche molecolari di questi ceppi è in corso tramite il sequenziamento dell' intero genoma.

BIBLIOGRAFIA

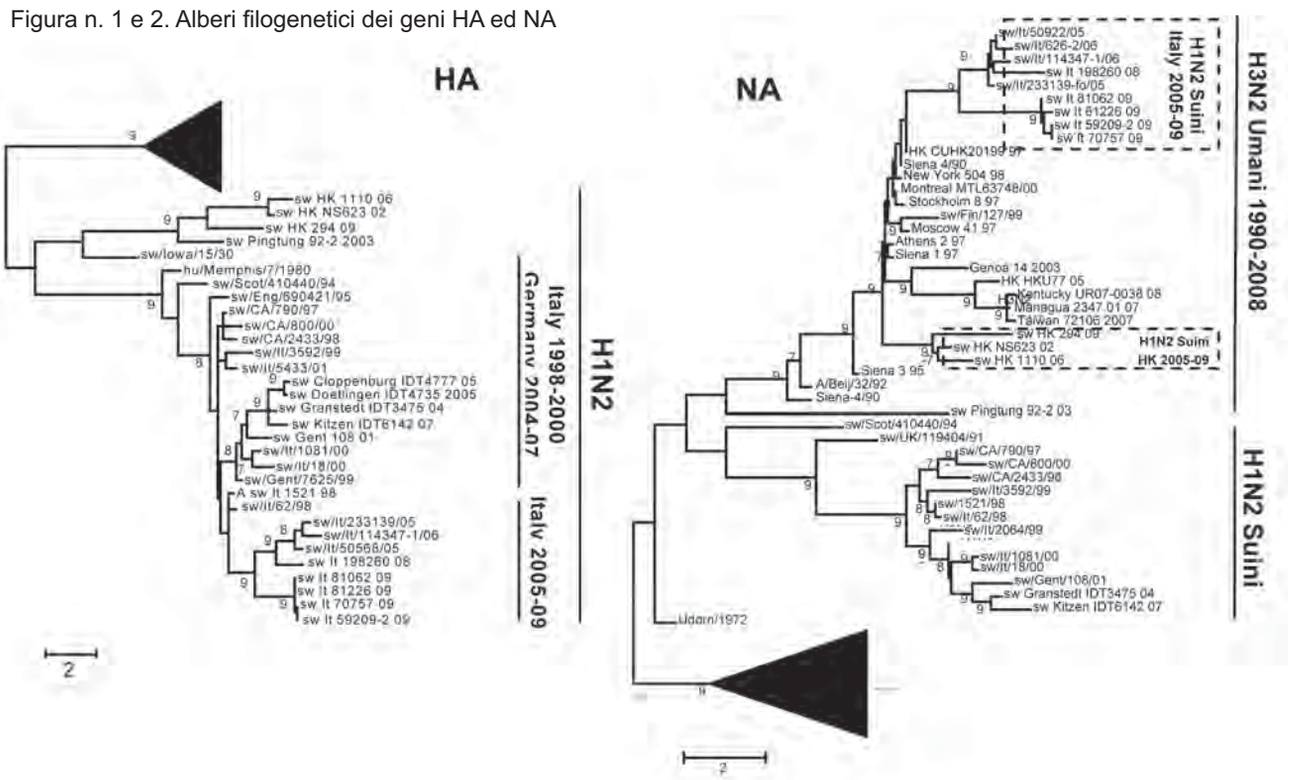
1- **Brown et al. (1998). J Gen Virol, 79: 2947-55**
2- **Chiapponi et al. (2003). 4th Int. Symp. On emergine and re-emerging pig diseases, Rome, pp 257-258**
3- **Hoffman et al. (2001). Arch Virol, 146: 2275-89**
4- **Lam et al. (2008). Virus Res, 131: 271-278**
5- **Marozin et al. (2002). J Gen Virol, 83: 735-745**
6- **Spackman et al. (2002). J Clin Microbiol, 40: 3256-60**
7- **Tacker et al. (2008). J Infect Dis, 197(1): S19-24**
8- **Tamura et al. (2007). Mol Biol and Evol, 24: 1596-99**

Tabella n.1 – Dati dei ceppi H1N2 caratterizzati

Ceppo	Anno	Prov	Categoria produttiva	Lesioni anatomo-patologiche	Altri patogeni	Seq. HA-NA
62	1998	MN	Magronaggio	n.r.*	n.r.	parziale
3592	1999	MN	Magronaggio	n.r.	n.r.	parziale
18	2000	FC	Svezzamento	Polmonite con epatizzazione	n.r.	parziale
50568	2005	CR	Magronaggio	Polmonite con epatizzazione griglia ai lobi apicali e medi		totale
233139	2005	PU	Svezzamento	Polmonite con epatizzazione		totale
626/2	2006	CR	Magronaggio	Polmonite con epatizzazione grigia ai lobi apicali e medi	PCV2, *P. multocida* *A.pleuropneumoniae 1*	totale
114347/1	2006	BG	Magronaggio	Polmonite con epatizzazione griglia		totale
198260	2008	BS	Svezzamento	Polmonite interstiziale. Necrosi focali miocardiche	ECMV	totale
70757	2009	BS	Magronaggio	Polmonite con epatizzazione grigia. Pleurite cronica	PCV2, *P. multocida*	totale
59209/2	2009	BS	Magronaggio	Polmonite polilobulare con epatizzazione. Pleurite localizzata	*P. multocida*	totale
81062	2009	BS	Sottoscrofa	Polmonite lobulare. Pleurite e pericardite fibrinosa	PRRS, *H. parasuis*	totale
81226	2009	PR	Svezzamento	Polmonite con epatizzazione lobulare monolaterale	PRRS	totale

*Dati non reperibili

Figura n. 1 e 2. Alberi filogenetici dei geni HA ed NA



CARATTERIZZAZIONE GENETICA E BIOLOGICA DI SRLV GENOTIPO E IN CAPRE DI RAZZA SARDA

Juganaru M.[1], Dei Giudici S.[2], Reina R.[1], Ponti M.N.[2], Bertolotti L.[1], Pedditzi A.[2], Profiti M.[1], Puggioni G.[2], Rosati S.[1]

[1]*Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Grugliasco, Torino.*

[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna. Sassari*

Key words: Lentivirus dei piccoli ruminanti, genotipo E, ELISA

ABSTRACT

SRLV control programmes are based on early diagnosis and isolation or culling of seropositive animals. ELISAs made with strain-specific antigens have improved serological diagnosis. The recently described low pathogenic caprine lentivirus genotype E of small ruminant lentiviruses (SRLV) has been identified in an Italian goat population of the Roccaverano breed. Specific serological identification of this cluster was achieved employing a home-made ELISA that uses recombinant p16-25 fusion protein derived either from genotypes E or B, thus serotyping circulating strains. Furthermore, commercially available tests could understimate genotype E seroprevalence in other goat populations. Here, we used a p16-25 based ELISA derived from genotype E to describe the presence of seropositive animals in the Sardinian goat population. Genotype E was present in most of the goat herds tested and none of the ovine flocks. Isolation of a viral strain was achieved from leukocytes in co-culture with choroid plexus cells. *In vitro* kinetics of this isolate indicated that genotype E in Sardinia shows CPE in fibroblastic cells. Complete genome sequence was obtained and some key sequences in the env are discussed.

INTRODUZIONE

I lentivirus ovicaprini sono un gruppo di agenti infettanti eterogenei dal punto di vista genetico, antigenico e biologico.

L'impatto economico di queste infezioni nell'allevamento caprino è principalmente legato alle forme articolari e mammarie sostenute dal genotipo B1 (Caprine Arthritis-Encephalitis Virus, CAEV), importato negli anni '80 con l'introduzione delle razze Alpine e Saanen.

Un nuovo genotipo (genotipo E) di SRLV è stato recentemente identificato in Piemonte come cluster a bassa patogenicità, non essendo associato ad alcun segno clinico caratteristico; l' analisi del genoma dello stipite Roccaverano, prototipo del genotipo E, ha rivelato delezioni naturali per dUTPase, VPR-like e per una ripetizione di 71pb nella regione U3 dell' LTR [1]. Anche se virus deleti per dUTPase e VPR-like hanno mostrato una crescita ridotta in cellule quiescenti (macrofagi) dovuto all'accumulo di mutazioni, lo stipite Roccaverano mostra *in vitro* un titolo elevato in macrofagi di derivazione sanguigna (BDM) e basso in colture di membrana sinoviale (SM) e plesso corioideo (PC). In un precendente lavoro é stato sviluppato un ELISA genotipo specifico e abbiamo dimostrato come gli animali infetti da un singolo ceppo appartenente ai genotipi A, B o E, mostrino una assorbanza significativamente maggiorre verso l'antigene omologo [2]. Gli animali co-infetti da più genotipi, identificati sulla base delle sequenze ottenute da leucociti di sangue periferico, mostrano invece una assorbanza mista. Cosí, utilizzando il citato metodo ELISA si é in grado di sierotipizzare gli stipiti circolanti in una popolazione.

In questa nota, abbiamo identificato sierologicamente la presenza del genotipo E in altre zone, diverse della Langa Astigiana, specificamente in Sardegna. Sucessivamente le sequenze ottenute da animali infetti hanno mostrato un grado di eterogenicitá tale da poter costituire il sottogruppo E2. Infine, é stato isolato e caratterizzato da un punto di vista genetico e biologico, un nuovo stipite appartenente al genotipo E, ma isolato in Sardegna da animali sintomatici.

MATERIALI E METODI

Siero e DNA

876 campioni di sangue intero sono stati ottenuti da 24 allevamenti caprini (571 animali) e da 20 ovini (305 animali). Da ciascun animale é stato ottenuto il siero utilizzato per il test sierologico.

Da alcuni animali é stato ottenuto anche il DNA da buffy coat usato nella PCR.

ELISA comparativo

É stato usato un test ELISA allestito con proteine del capside virale ricombinanti dei genotipi B ed E precedentemente descritto [2].

PCR, sequenziamento e analisi filogenetica

E' stata amplificata una regione del gene gag di circa 800 nt usando una nested PCR, eseguendo un protocollo già descritto [3].

Le sequenze sono state analizzate valutando la proporzione di transizioni G↔A.

La struttura della popolazione virale è stata valutata mediante l'analisi della varianza molecolare (AMOVA software Arlequin, [4]), valutando l'effetto della segregazione per allevamento nella suddivisione della popolazione.

L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando approcci bayesiani (software MrBayes, [5]) e sull'identificazione dei migliori modelli evolutivi (software ModelTest, [6]).

Isolamento, attività in vitro ed amplificazione del genoma virale

Lo sitpite **Seui** é stato isolato da una capra adulta con sintomi compatibili con artrite indotta da SRLV. Leucociti di sangue periferico sono stati co-coltivati con cellule di membrana sinoviale e passati settimanalmente fino alla comparsa dell'effetto citopatico (sincizi). Il sovranatante contenente particelle virali infettive, é stato usato per infettare cellule di membrana sinoviale (GSM) e la produzione di virus valutata tramite l'attiviá retrotrascritasica. Infine, il DNA ottenuto dalle culture infette é stato usato per amplificare in 6 passaggi (LTR, LTR-gag, gag, gag-pol, pol, pol-LTR) il genoma completo.

RISULTATI

I risultati ELISA mostrano la presenza del genotipo E in Sardegna. In alcuni casi, a livello del singolo individuo, questa sieropositivitá é stata osservata insieme ad una alta assorbanza verso l'antigene del genotipo B, indicando la presenza di possibili coinfezioni. La distribuzione degli allevamenti positivi al genotipo E è rappresentata nella figura 1. Tutti gli allevamenti ovini sono risultati negativi al genotipo E. L'80 % degli allevamenti caprini, invece hanno mostrato positivitá agli antigeni del genotipo E.

I risultati sierologici sono stati confermati tramite PCR e sequenziamento dei prodotti ottenuti. La nested PCR é stata in grado di rilevare delle positivitá sia in buffy coat che in cellule dal latte. La sequenza indica l'appartenenza del cluster Sardo al genotipo E e il grado di similaritá con il cluster di Roccaverano (84%), indica d'accordo con in criteri usati per HIV, che si tratta del grupo E2. É interessante come l'epitopo immunodominante della proteina p25, utilizzata in ELISA sia identico per intrambi i cluster, confermando la specificità dell'ELISA. Successivamente sono state amplificate altre regioni del genoma confermando le delezioni caratteristiche del genotipo E nelle regioni LTR, dUTPase e VPR.

L'analisi delle sequenze parziali del gene *gag* ha rivelato una similarità media del 84,34% tra il sottotipo E2 sardo e il prototipo Roccaverano del sottotipo E1. Il numero medio di transizioni G↔A (25.39% delle mutazioni totali) è simile allo stipite Roccaverano (27,16%), confermando che, nonostante le delezioni presenti lungo il genoma, il genotipo E non presenta ipermutazioni relative alla transizione G↔A. L'AMOVA evidenzia segregazione spaziale significativa all'interno della popolazione virale, indicando il mantenimento di specifiche varianti virali all'interno degli allevamenti. Questo dato è confermato dalla topologia degli alberi filogenetici, che raggruppano le sequenze come monofiletiche. Le analisi evolutive condotte evidenziano che la popolazione virale è da considerarsi costante e che la velocità di evoluzione sembra essere maggiore di quelle calcolate per gli altri genotipi.

É stata osservata una alta RT activity nei sovrananti di cellule GSM infette con lo stipite Seui, mostrando il tipico effetto citopatico indotto la lentivirus dei piccoli ruminanti (Figura 2).

L'amplificazione del genoma completo mostra come le differenze genetiche sono rilevabili in tutti i geni. In particolare, la regione corrispondente alla dUTPasi, é caratterizzata da una sequenza residuale di lunghezza identica a quella trovata nello stipite Roccaverano, ma con una composizione nucleotidica diversa. Alcuni dei motivi considerati potenziali siti di unione al recettore cellulare del gene env (HV1 e HV2), sono nello stipite Seui, piú vicini al CAEV classico che al Roccaverano. In piú, questi motivi si mantengono costanti nelle sequenze ottenute da sangue e sinovia dello stesso animale.

CONCLUSIONI

I dati sierologici e di PCR dimostrano la presenza del genotipo E previamente descrito soltanto nella razza di Roccaverano, in altre popolazioni caprine come la razza sarda La distribuzione del genotipo E nella popolazione caprina italiana puó ancora essere largamente sottovalutata a causa della variabilitá antigenica dei SRLV particolarmente nei epitopi immunodominanti del gene gag, ampiamente impiegati nei test sierologici. Le sequenze *gag* dei intrambi i cluster appartenenti al genotipo E, mostranno una similaritá media del 84% suggerendo la possibile attribuzione di un sottotipo E2 al cluster sardo. Paragonato con il cluster piemontese, Il cluster E2 sembra evolvere con una velocitá leggermente superiore, e senza accumulo di mutazioni G↔A. Contrariamente al cluster E1, i modelli evolutivi indicano che la grandezza della popolazione virale sarda rimane costante nel tempo. Questo fatto é stato precedentemente osservato per quanto riguarda il genotipo B altamente patogeno. Questo risultato suggerisce, insieme ai dati clinici, il possibile ruolo della gestione degli animali sintomatici (allontanamento e/o macellazione) nella crescita popolazione virale. I dati di sequenzamento mostrano inoltre che le tre delezioni tipiche del genotipo E sono presenti anche nel cluster Sardo. Questo, insieme ai dati ottenuti dal cluster Piemontese, fanno pensare a queste delezioni come marker specifici di questo genotipo. La sequenza residuale corrispondente alla dUTPase, molto diversa tra i due cluster, suggerisce la perdita di questo enzima nel corso dell'evoluzione e la funzione residuale di spacer fra le subunità RNaseH ed integrasi della RT. La differenza piú eclatante tra gli stipiti riguarda la capacità del ceppo sardo di replicare in modo efficiente in cellule di membrana sinoviale caprina, generalmete usate per l'isolamento virale. In piú, l'effetto citopatico é stato osservato 7 giorni P.I., mostrando un comportamento tipico dei ceppi CAEV-like. Le sequenze delle regioni HV1 e HV2 coinvolte nella interazione virus-cellula, presenti in Seui sono piú vicine a isolati di membrana sinoviale di stipiti di CAEV che a Roccaverano. L'allestimento di un entry assay per valutare questa possibilitá é in corso di studio. In conclusione questo studio mette in evidenza come la diagnostica sierologica basata su antigeni multi-sitipite assicura l'identificazione e la determinazione della prevalenza reale del genotipo E. Il genotipo E é presente come cluster E2 in Sardegna come possibile cluster patogenico. La sua replicazione in cellule di membrana sinoviale, a differenza del sottotipo E1, offre una nuova prospettiva per studiare ceppi omologhi a differente attività patogena.

Figura 1. Distribuzione degli allevamenti caprini positivi per la ricerca sierologica del genotipo E in Sardegna

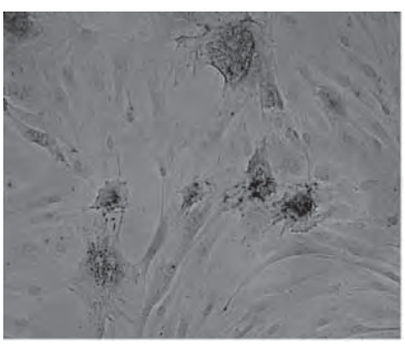


Figura 2. Immunocitochimica su cellule di membrana sinoviale infettate con lo stipite Seui.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] Reina R, Grego E, Bertolotti L, De Meneghi D, Rosati S. Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. J Virol 2009;83(2):1152-5.
[2] Reina R, Grego E, Profiti M, Glaria I, Robino P, Quasso A, et al. Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. Vet Microbiol 2009, in press.
[3] Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, et al. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. J Gen Virol 2007;88(Pt 12):3423-7.
[4] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 2005;1:47-50.
[5] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. . Bioinformatics (Oxford, England) 2003;19:1572-4.
[6] Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst Biol 2004;53(5):793-808.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI ASTROVIRUS AVIARI

Canelli E., Tittarelli C., Barbieri I., Ceruti R.°, Pennelli D.*, Lavazza A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Brescia, Italia
*°Gruppo Amadori, Cesena Italia * Veterinario libero professionista*

Keywords: avian astrovirus, electron microscopy, PCR, phylogenetic analysis,

SUMMARY
Astroviruses are non-enveloped SRVs. In this study we analyzed 318 samples of intestinal content conferred to the laboratory since 2008. The samples were analyzed firstly by negative staining electron microscopy (nsEM) and 68 samples were found positive for entero-like or astro-like viruses. All these samples were analyzed with RT-PCR, searching for astrovirus-RNA, and, if positive, sequenced and genetically analyzed. Primers used for PCR and sequencing target ORF1b. The obtained data demonstrate that this gene presents a certain genetic variability, even among astroviruses of the same species.

INTRODUZIONE
A partire dagli anni '80 si è osservato un progressivo aumento dell'incidenza e, di conseguenza, dell'importanza delle forme enteriche nelle specie avicole, soprattutto nelle prime settimane di vita e, ad oggi, rappresentano una delle maggiori cause di perdita economica per l'allevamento avicolo. In particolare, nelle enteriti di origine virale sono coinvolti diversi virus che agiscono in associazione a varie concause (fattori alimentari, manageriali ecc.) [3]. Tra i virus segnalati compaiono anche gli astrovirus. Questi appartengono al gruppo dei Small Round Virus (SRV) ovvero virus a RNA, privi di envelope di 25-35 nm di diametro. Il loro nome deriva dal fatto che presentano 5 o 6 proiezioni sulla superficie che ricordano una stella, anche se questa morfologia non è sempre mantenuta o distinguibile, infatti, in microscopia elettronica possono essere confusi con altri SRVs o Entero-Like Virus (ELV). Tassonomicamente appartengono al genere *Avastrovirus* della famiglia *Astroviridae*. Il loro genoma è costituito da un RNA di 6.8-7.9 Kb e presenta una 5'UTR seguita da tre ORF, una 3'UTR e una coda poly-A. In particolare l'ORF1b codifica per la RNA polimerasi-RNA dipendente. Questo gene è altamente conservato, se confrontato con altri, come ad esempio l'ORF2. Gli astrovirus infettano e causano patologie in varie specie; in quelle aviari sono correlate ad enterite e aumento della mortalità in soggetti giovani di tacchino, pollo e faraona, di nefrite nel pollo e di epatite mortale negli anatroccoli. Negli USA vengono associati alla Poult Enteritis and Mortality Syndrome – PEMS del tacchinotto. Anche in Italia sono stati riportati vari casi di enterite riconducibili a questi virus soprattutto in allevamenti intensivi di tacchini e faraone [5]. In realtà la vera diffusione degli astrovirus non è ancora conosciuta, probabilmente anche a causa dell'assenza di strumenti diagnostici specifici per il loro rilevamento. La diagnosi definitiva è, infatti, complicata dal fatto che questi virus non sono generalmente coltivabili *in vitro* mentre le tecniche di microscopia elettronica in colorazione negativa (nsEM) pur essendo impiegate nella diagnosi di routine, non sono sempre in grado di distinguere tra i virus morfologicamente simili agli astrovirus e nemmeno tra i diversi tipi di astrovirus; ciò rende ragione del fatto che spesso la diagnosi riporta la definizione generica di enterovirus-like. Recentemente, per la differenziazione dei vari astrovirus sono state principalmente utilizzate la RT-PCR e il sequenziamento del genoma virale.

MATERIALI E METODI
In questo studio sono stati analizzati tutti i campioni costituiti da contenuti intestinali, conferiti dal 1 gennaio 2008 al Laboratorio di Microscopia Elettronica dell'IZSLER di Brescia, provenienti da vari allevamenti dislocati sul territorio nazionale, con un'anamnesi di sindromi enteriche o di sospetta enterite virale. Inoltre sono stati sottoposti ad analisi anche i campioni di due studi longitudinali, rispettivamente in un allevamento di faraone del Centro Italia e in 13 allevamenti di polli da carne del Nord Italia appartenenti alla stessa filiera integrata, nei quali si registravano episodi ricorrenti, ma non continuativi di sindromi enteriche, caratterizzate da quadri diarroici e/o presenza di scarti e ritardo di crescita a partire dagli 8-12 gg di età. Nel primo studio sono stati prelevati cieco e duodeno di alcuni soggetti da due distinti capannoni di faraone della stessa azienda ai giorni 8, 14, 21, 25 e 30 di vita degli animali; nel secondo studio sono stati prelevati campioni tra i 3 e 17gg di età per un totale di 70 campioni. Tutti i campioni (n=318) sono stati analizzati mediante osservazione in nsME previa ultracentrifugazione con Airfuge Backman [6]. Quindi i campioni positivi per particelle enterovirus-like (n=68, circa 20% sul totale), che solo raramente presentavano morfologia riferibile ad astrovirus, sono poi stati analizzati in RT-PCR per la ricerca del RNA di astrovirus, e, se positivi, sequenziati e analizzati geneticamente. Per quanto riguarda gli studi longitudinali è stata sequenziata solo una selezione di campioni positivi. I primer utilizzati sono primer degenerati descritti da Tang *et al.* (TAPG-L1: pos. 3835-3853; TAPG-R, pos. 4414-4432) [4]. I prodotti amplificati del peso atteso (601 bp) sono poi stati sequenziati dopo purificazione con gli stessi primers della RT-PCR, in entrambe le direzioni, e analizzati filogeneticamente utilizzando BLAST. L'allineamento delle sequenze è stato calcolato utilizzando CLUSTAL W e l'analisi filogenetica è stata costruita utilizzando PAUP. Le sequenze di campioni analizzati sono poi state confrontate con quelle dei ceppi di riferimento e con quelle di ceppi riportati in altre pubblicazioni e presenti in Gen Bank.

RISULTATI
L'esame dei campioni di tacchino, pollo e faraona conferiti al laboratorio è stato inizialmente eseguito, come di routine, mediante esame nsME, dimostrando la presenza di SRVs o ELV o di virus simil-astrovirus, confermati per la maggior parte come astrovirus nella successiva analisi in RT-PCR.

***Tab.1**: Campioni negativi e positivi per ELVs alla nsME*

Anno (periodo)	Specie	Tot	Neg ELVs	Pos ELVs
2008 (01/1-31/12)	Faraona	15	9	6
	Pollo	151	126	25
	Tacchino	43	34	9
2009 (01/01-31/05)	Faraona	22	11	11
	Pollo	87	70	17
	Tacchino	0	0	0
TOTALE		318	250	68

In un secondo momento anche alcuni campioni negativi degli studi longitudinali sono stati esaminati con la RT-PCR ottenendo una percentuale di campioni positivi più alta rispetto alla nsME, sottolineando quindi la sensibilità maggiore della RT-PCR, oltre alla maggiore specificità. D'altra parte, però, alcuni campioni individuati in ME non sono stati confermati in PCR.

Se si considerano i dati nella loro completezza, indipendentemente dalla specie, la maggioranza delle particelle rilevate in nsME era riferibile ad ELV. Nell'ambito delle diverse specie, mentre gli ELV erano predominanti in pollo e faraona, gli astrovirus-like erano sicuramente frequenti nel tacchino. Le particelle entero-like o astro-like sono state individuate come uniche particelle virali presenti nella maggioranza dei campioni di pollo (31/238); mentre in molti casi, sono stati visualizzate in infezioni virali miste, in particolare, con una certa frequenza, in associazione a rotavirus, specie nel tacchino.

Gli ampliconi della dimensione attesa per la ORF1b sono stati ottenuti da 70 su 109 campioni totali processati in RT-PCR, confermando la presenza di astrovirus nella maggioranza dei campioni visti in nsME e, come già detto, anche in alcuni campioni provenienti dagli studi longitudinali, risultati negativi in nsME. L'analisi e la comparazione delle sequenze attraverso la ricerca in BLAST ha confermato l'identità dei prodotti amplificati con astrovirus. L'albero filogenetico derivato dall'analisi effettuata e illustrato in Figura 1 indica chiaramente la distinzione dei campioni analizzati in due cluster principali, il primo comprendente TAstV-2 e astrovirus della faraona, il secondo formato da CAstV. Non sono stati rilevati virus clusterizzati con ANV o con TAstV-1.

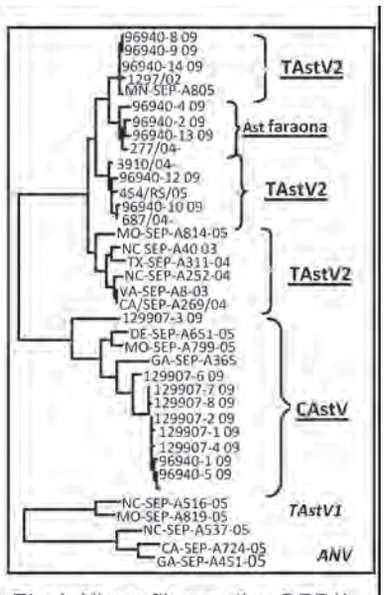


***Fig.1** Albero filogenetico ORF1b*

All'interno del primo cluster sono visibili almeno quattro diversi lineaggi: tre per il tacchino e uno per la faraona.

I campioni in analisi si dispongono, per il TAstV-2, in soli due cluster, mentre fanno parte del terzo lineaggio di tacchino solo sequenze di astrovirus presenti in Gen Bank. In generale i tre lineaggi di tacchino, pur essendo correlati al TAstV-2, presentano una divergenza tra loro maggiore del 12%, mentre al loro interno presentano un'omologia maggiore del 98,5%, 96,2% e 92,2%, rispettivamente. In particolare il gruppo di sequenze di campioni di faraona si dispone in un ramo a parte (omologia nel gruppo 96.2%) rispetto ai lineaggi di tacchino (omologia media con i tre lineaggi 90%). Anche tra i ceppi di pollo ve ne sono alcuni che formano un cluster omogeneo (97,8% di omologia), mentre altri tendono a disporsi in rami differenti arrivando ad un'eterologia del 20.8% rispetto al cluster principale. Queste distinzioni sono supportate da buoni valori di bootstrap e l'analisi filogenetica eseguita sull'ORF1b evidenzia quindi una certa variabilità genetica negli astrovirus di specie diverse, ma anche all'interno di una stessa specie. A livello nucleotidico la similarità delle sequenze dei campioni di tacchino è stata molto bassa con il TAstV-1 (62.6%); pertanto i ceppi di tacchino TAstV-2 risultano più simili ai ceppi di faraona e di pollo rispetto a quelli di tacchino del tipo 1. Di alcuni campioni (n=9) non è stato possibile analizzare la sequenza in quanto mista e non leggibile.

DISCUSSIONE

Nelle indagini condotte con metodi di microscopia elettronica in allevamenti avicoli con sintomatologia enterica e in particolare di tacchini, gli astrovirus sono stati i virus più comunemente individuati. Basandosi sulle premesse indicate e sui dati ottenuti, l'utilizzo della nsME per il rilevamento di particelle di SRV si è confermato un metodo molto utile per l'individuazione e lo screening di queste particelle virali in campioni intestinali e fecali, pur non permettendo in molti casi ulteriori discriminazioni. La presenza frequente di rotavirus in associazione ad astrovirus e il fatto che questi due virus siano i più frequentemente individuati nei campioni analizzati in nsEM in questo studio, conferma quanto descritto da altri Autori (M. Saif, comunicazione personale), circa il loro effetto sinergico nel causare quadri conclamati e gravi di enterite virale aviare. Viceversa nulla di definitivo si può dire sul ruolo e capacità dei singoli virus a causare enterite, la cui sola osservazione, spesso in quantità variabili, non è prova definitiva che siano la causa primaria della patologia enterica. L'utilizzo dei primer degenerati precedentemente descritti [4], ha permesso l'amplificazione di almeno tre diversi astrovirus aviari (astrovirus della faraona, TAstV-2, CAstV), ma non la differenziazione in tipi che è stata ottenuta mediante sequenziamento genetico. Mediante RT-PCR, inoltre, non è stato possibile valutare eventuali infezioni miste con tipi differenti di astrovirus. Per quei campioni che hanno dato come esito sequenza mista, sono previste ulteriori analisi con coppie di primer specifiche per i differenti astrovirus.

È interessante notare che la regione conservata della polimerasi contiene in ogni caso un certo numero di variazioni genetiche. In accordo con studi recenti in Italia [1] e negli USA [2], è stata osservata una variabilità genetica per la ORF1b all'interno degli astrovirus in particolare del TAstV-2, ma in questo studio è apparsa evidente anche una certa eterologia all'interno del CAstV. La presenza di virus geneticamente non identici all'interno di uno stesso cluster fa ipotizzare che ci sia una co-circolazione di differenti tipi genetici nella stessa popolazione. Dagli studi longitudinali effettuati, i campioni raccolti in un allevamento, all'interno di uno stesso capannone hanno rivelato una popolazione genomica del tutto omogenea, ma in alcuni casi, anche all'interno di uno stesso capannone sono stati rilevati ceppi non completamente omologhi. Questo indica che differenti tipi genetici possono coesistere nella stessa unità produttiva, confermando recenti dati degli USA [2]. Dato che tutti i campioni sono stati prelevati nelle prime settimane di vita dell'animale non si possono fare correlazioni tra rilevamento dei diversi tipi di virus e momento del ciclo produttivo, ad eccezione dello studio longitudinale sulle faraone che dimostra la presenza dell'astrovirus dall'ottavo al trentesimo giorno di vita. Da rilevare che anche in questa indagine si sono confermati i dati di frequenza delle virosi enteriche aviari in relazione all'età dei soggetti; il picco, anche quantitativo, di escrezione si aveva dal 10-12 gg al 20gg circa nella faraona e dal 6-7 a 14-15 giorni nel pollo e tacchino. Il mancato rilevamento di TAstV-1 tra i campioni analizzati è in accordo con lo studio di Cattoli *et al*., 2007 [1] che descrive una sporadica presenza in Italia. Ulteriori studi sono necessari per determinare la diffusione degli astrovirus negli allevamenti avicoli e per valutare la relazione causa-effetto e il ruolo definitivo nelle sindromi enteriche nelle quali sono coinvolti.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Cattoli G., De Battisti C., Toffan A., Salviato A., Lavazza A., Cerioli M., Capua I. (2007), Arch Virol, 152, 595-602
2. Pantin-Jackwood M., Spackman E., Woolcook PR (2006), Virus Genes 32, 187-192
3. Pascucci S., Lavazza A. (1993), Zoot. Internat., feb. 1993
4. Tang Y., Ismail M. M., Saif Y. M. (2005), Av. Dis. 49, 182-188
5. Toffan A., De Battisti C., Lavazza A., Cerioli M., Salviato A., Terregino C., Cattoli G., (2005) Atti del primo workshop di virologia veterinaria, Roma 2005
6. Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D., (1990). Vet Rec, 126: 581

MULTIPLEX REAL TIME PCR PER IL RILEVAMENTO DI CLOSTRIDIUM CHAUVOEI, CLOSTRIDIUM *SEPTICUM* E *BACILLUS ANTHRACIS*.

Galante D. , Garofolo G. , Serrecchia L. , Fasanella A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia and Basilicata, Unità Operativa C.P.O. - Via Manfredonia, 20 – 71100 Foggia (Italy);

Key words: *Bacillus anthracis, Clostridium chauvoei, Clostridium septicum,*

INTRODUZIONE

Clostridium chauvoei e Clostridium septicum sono agenti infettivi che determinano tossinfezioni a carattere acuto ed iperacuto, ad evoluzione fatale, spesso non accompagnate da sintomi patognomonici in grado di differenziare le due patologie. Caratteristica comune a tutti gli altri clostridi è quella di produrre esotossine durante la fase di replicazione e di formare spore molto resistenti in grado di favorire la sopravvivenza in ambiente esterno anche per moltissimo tempo (2). Il livello di contaminazione ambientale sembra strettamente correlato con la presenza della malattia e questo aspetto rende difficile il successo di eventuali programmi di eradicazione. Sappiamo ben poco sulla diffusione di *C. septicum* e *C. chauvoei* ed inoltre nella bibliografia mondiale c'è carenza di dati sulle loro potenzialità zoonosiche (3,7). I metodi tradizionali di identificazione dei clostridi (isolamento, prove biochimiche, immuonofluorescenza, neutralizzazione delle tossine) sono lunghi, indaginosi e talvolta non sempre conducono ad una esatta diagnosi. Inoltre le stesse tecniche di biologia molecolare non sempre risultano efficaci come screening differenziale in quanto *C. chauvoei* e *C. septicum* hanno un elevato grado di omologia (4). In questo lavoro abbiamo messo a punto una multiplex Real Time PCR con analisi delle curve di melting quale strumento diagnostico differenziale. Il test è stato sviluppato con il preciso obiettivo di offrire ai laboratori di diagnostica di istituti scientifici che lavorano nel settore della sanità pubblica un test rapido ed efficace. Inoltre aver ampliato il raggio di attività diagnostica del test anche a *Bacillus anthracis,* offre la possibilità agli operatori di mettere in atto tutte quelle misure di biosicurezza che sono d'obbligo nel caso di manipolazione di carcasse infette con agenti altamente patogeni.

MATERIALI E METODI

CEPPI

Sono stati testati i seguenti ceppi batterici:

n. 1 *Clostridium chauvoei* certificato ATCC 19399
n. 1 *Clostridium chauvoei* certificato NCTC 13023
n. 1 *Clostridium septicum* certificato NCTC 286
n. 1 *Clostridium septicum* certificato NCTC 547
n. 3 *Clostridium septicum* di campo
n. 1 *Bacillus anthracis* ceppo A0843
n. 1 *Bacillus anthracis* ceppo A0840
n. 1 *Clostridium haemolyticum* certificato NCTC 9693
n. 1 *Clostridium carnis* certificato NCTC 13036
n. 1 *Clostridium botulinum A* certificato NCTC 3805
n. 1 *Clostridium botulinum B* certificato NCTC 751
n. 1 *Clostridium botulinum D* certificato NCTC 8265
n. 1 *Clostridium botulinum F* certificato NCTC 10281
n. 1 *Bacillus cereus* certificato ATCC 10876
n. 2 *Clostridium spp*. di campo

ESTRAZIONE DEL DNA

I ceppi *Clostridium spp*. sono stati seminati su agar sangue ovino 5% e incubati a + 37°C per 48 ore in anaerobiosi con giara (Oxoid - volume 3,5 lt).
Bacillus anthracis e Bacillus spp. sono seminati su agar sangue ovino 5% e incubati a + 37°C per 24 ore in aerobiosi
L'estrazione del DNA genomico dalle colonie è stata realizzata con il Kit DNeasy BLOOD AND TISSUE KIT (Qiagen) secondo la metodica di estrazione per i batteri Gram positivi.

PCR

Per la scelta dei primers sono stati selezionati 3 target genici specie specifici riportati in letteratura. Per *Clostridium septicum* gli oligonucleotidi specifici sono stati disegnati sul gene della tossina alpha (Hemolysin-GenBank accession number D17668) (8), per *Clostridium chauvoei* sulla regione spaziatrice ribosomiale 16S-23S rRNA (rRNA16-23S spacer region-GenBank accession number AB040542) (5,6), ed infine per *Bacillus anthracis* sul gene PagA del plasmide pXO1 (PagA-GenBank accession number AF306782) (1) (tabella 1). Per mettere a punto la multiplex abbiamo verificato che le tre coppie di primers avessero una temperatura di annealing simile in modo da poterli usare nelle medesime condizioni di ciclo. La reazione è stata realizzata su Mastercycler realplex Eppendorf. Il volume finale (25µl) della mix era così costituito: 12,5 µl di Faststart Syber Geen Master Rox (Roche), 0,150 µM EMO primers, 0,340 µM IGSC4 primers, 0,200 µM PAG23/24 primers e 2,5 µl di DNA estratto.
Le condizioni di ciclo usate sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, seguita da 28 cicli consistenti in 15 sec di denaturazione a 95°C, 30 sec di annealing a 55°C e 30 sec di estensione a 72°C. I cicli sono stati seguiti da un estensione finale di 10 minuti a 72°C. Dopo la fine della reazione di amplificazione è stata effettuata l'analisi delle curve di melting, con il software mastercycler ep realplex 1.0 (Eppendorf) (da 55°C a 95°C in 10 minuti), per l'identificazione degli ampliconi. Inoltre, come ulteriore conferma i prodotti di PCR sono stati visualizzati con elettroforesi su gel di agarosio al 1,8% con 0,5µg/ml di bromuro di etidio su transilluminatore a raggi UV (Eagle EyeII, Stratagene).
Nel seguente lavoro non sono stati effettuati test di amplificazione su più DNA contemporaneamente.

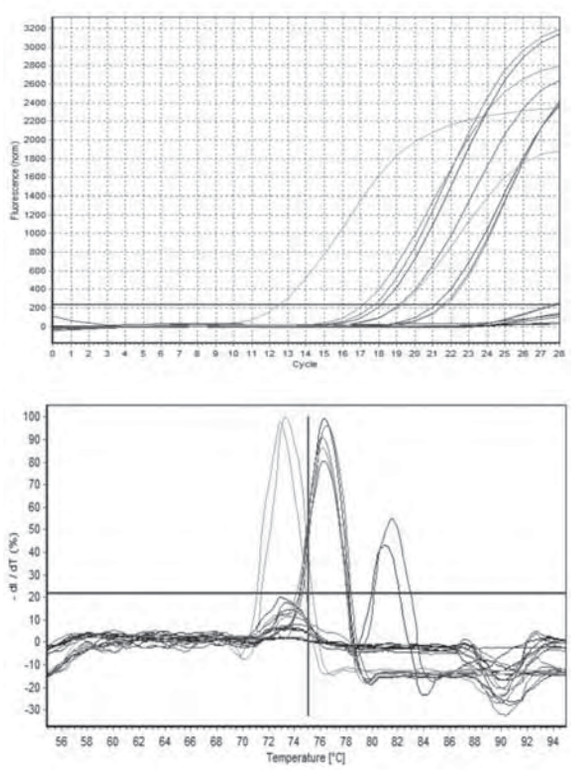
RISULTATI

La mix dei primers utilizzati ha sempre amplificato in maniera specifica e selettiva il DNA dei ceppi di *B. anthracis*, di *C. chauvoei* e *C. septicum*. Non ci sono state interferenze nei processi di amplificazione e non sono stati registrati falsi positivi, né inibizioni dei processi di amplificazione dovute a interferenze fra i diversi primers. Le curve di melting risultano discriminanti in quanto le temperature sono nettamente distinte fra di loro (figura 1).

Tabella 1 – Primers utilizzati, lunghezze degli ampliconi e temperature di melting osservate.

Specie batterica	Primer	Regione amplificata	Sequenza	pb	Melting°C
B. anthracis	PAG23 F	PagA Plasmide pXO1	CTACAGGGGATTTATCTATTCC	151	72.5±0.4
	PAG24 R		ATTGTTACATGATTATCAGCGG		
C. chauvoei	IGSC4 F	16S-23S rRNA	GAATTAAAACAACTTTATTAACAAATG	215	81.3±0.3
	IGSC4 R		CTCCGGATCACTGGCTATGT		
C. septicum	EMO F	Alpha toxin	AATTCAGTGTGCGGCAGTAG	270	76.3±0.3
	EMO R		CCTGCCCCAACTTCTCTTTT		

Figura 1 – Plots di amplificazione e rispettive curve di melting dei diversi DNA testati.



DISCUSSIONE

Il presente lavoro rientra in un progetto che ha come obiettivo finale quello di mettere a punto delle sonde tipo Taqman in grado di aumentare la specificità del test. La mancanza di dati nella bibliografia scientifica internazionale sulla caratterizzazione molecolare di *C. chauvoei*, ha reso complicato lo studio del saggio, tuttavia i risultati di questa prima fase appaiono estremamente lusinghieri, in quanto gli amplificati presentano delle curve di melting ben distinte fra loro. Questo facilita molto l'interpretazione del risultato garantendo una diagnosi differenziale tra gli agenti che causano l'antrace, il carbonchio sintomatico e l'edema maligno. Va sottolineato che alcuni ceppi di campo, che sulla base dei classici test biochimici erano stati identificati come *C. chauvoei*, sono risultati negativi all'analisi biomolecolare. L'eventuale adozione di questo test rapido nelle tecniche di base dei laboratori di diagnostica veterinaria, oltre a migliorare la qualità del risultato, favorirebbe una migliore conoscenza sulla reale diffusione di queste particolari clostridiosi. Un punto di forza di questo test è rappresentato dalla elevata sensibilità dimostrata per il rilevamento del DNA di *Bacillus anthracis,* poiché in caso di positività ad antrace, gli operatori hanno la possibilità di poter adottare tutte quelle misure di protezione individuale previste per la gestione di carcasse infette. Il test biomolecolare adottato ridurrebbe sensibilmente i tempi di diagnosi.

Bibliografia

1) Fasanella A, Losito S, Trotta T, Adone R, Massa S, Ciuchini F, Chiocco D., 2001. Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction. *Vaccine*. Jul 20;19(30):4214-8.

2) Uzal FA, Hugenholtz P, Blackall LL, Petray S, Moss S, Assis RA, Fernandez Miyakawa M, Carloni G., 2003. PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formaline-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Microb*. 91:239-248.

3) Nagano N, Isomine S, Kato H, Sasaki Y, Takahashi M, Sakaida K, Nagano Y, Arakawa Y., 2008. Human Fulminant Gas Gangrene Caused by *Clostridium chauvoei*. *J.Clinic Microbiology* Apr;46(4):1545-7. Epub 2008 Feb 6.

4) Sasaki Y, Yamamoto K, Kojima A, Norimatsu M, Tamura Y., 2000. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Res. Vet. Sci*. Dec;69(3):289-94. Erratum in: *Res Vet Sci* 2001 Feb;70(1):93-4.

5) Sasaki Y, Yamamoto K, Amimoto K, Kojima A, Ogikubo Y, Norimatsu M, Ogata H, Tamura Y., 2001. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and Clostridium septicum. *Res. Vet. Sci*. Dec;71(3):227-9.

6) Sasaki Y, Yamamoto K, Kojima A, Tetsuka Y, Norimatsu M, Tamura Y., 2000. Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. *J. Vet. Med. Sci*. 62 (12): 1275-1281.

7) Seder MD, Kramer S, Long D, Uzieblo MR, Shanley CJ and Bove P., 2009. *Clostridium septicum* aortitis: Report of two cases and review of the literature. *J Vasc Surg*. May;49(5):1304-9May;49(5):1304-9.

8) Takeuchi S, Hashizume N, Kinoshita T, Kaidoh T, Tamura Y., 1997. Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci*. Sep;59(9):853-5.

SUMMARY

In the present study a multiplex PCR real time is described as diagnostic, differential tool to detect anthrax, blackleg and malignant oedema. Sudden deaths of grazing ruminants such as cattle, sheep and goats that show a symptomatology related to hyperacute infective processes, made necessary the study and the setting of a rapid and precise diagnostic molecular method. Specific primers for protective antigen gene (PA) of Bacillus anthracis, for alpha toxin gene of Clostridium septicum and for the spacer region 16S-23S rRNA of Clostridium chauvoei were used. The authors confirmed the efficacy and the specificity of this test by the analysis of melting curves, showing the presence of 3 highly different temperaturures.

Collaborazione tecnica: Angela Aceti, Nicola Nigro, Rosa d'Errico
Finanziamento: Ricerca Finalizzata 2006 "DIAGNOVA"

INDAGINE SULLA PRESENZA DI PATOGENI IN TOPI E RATTI DA LABORATORIO DI ALLEVAMENTI E CENTRI DI SPERIMENTAZIONE

Martinelli N., Lombardi G.

Reparto Animali da Laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", sede di Brescia

Keywords: mice, rat, pathogens

SUMMARY

In this report prevalence rates of mice and rats pathogens in laboratory animal are presented. In mice and rats the most detected infectious agent was *M. pulmonis* (43,5%) followed by mouse hepatitis virus (36,6%) in mice and by Theiler's virus in rats. Although health status is very important in laboratory animals, several infectious agents are still circulating in mice and rats colony.

INTRODUZIONE

Il monitoraggio sanitario degli allevamenti di animali da laboratorio è di fondamentale importanza per mantenere un buon livello di benessere e di qualità della ricerca.

Lo stato sanitario degli animali sottoposti a sperimentazione influenza considerevolmente la validità e la riproducibilità degli studi effettuati(1). L'utilizzo di topi privi di agenti patogeni che possono interferire con la ricerca, può ridurre il numero di animali utilizzati, contribuendo a migliorarne il benessere.

Per l'utilizzo degli animali nella ricerca e nella diagnostica sono stati sviluppati piani di controllo sanitario; numerose pubblicazioni forniscono una guida per la stesura e lo sviluppo di piani di monitoraggio sanitario per i roditori.

Nonostante le misure sanitarie molto strette e il monitoraggio, molte colonie continuano ad ospitare agenti patogeni.

Secondo le raccomandazioni della Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA), negli allevamenti e nei centri di ricerca, andrebbero eseguite analisi per escludere la presenza di tutti i patogeni almeno una volta all'anno, mentre quelli maggiormente diffusivi e pericolosi andrebbero monitorati ogni 3 mesi(2).

In questo studio sono riportati dati sui patogeni più diffusi tra i topi e i ratti utilizzati in alcuni centri di ricerca in Italia.

MATERIALI E METODI

Il reparto "Animali da laboratorio" dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna di Brescia sta sviluppando l'attività di diagnostica delle patologie degli animali da laboratorio in collaborazione con diversi centri di sperimentazione ed allevamento.

Per questo studio sono stadi selezionati 68 conferimenti di materiale biologico da analizzare per screening sanitario o per sospetto clinico, negli ultimi tre anni. In totale sono stati analizzati 337 sieri di topi provenienti da 14 centri di ricerca e sperimentazione, e 180 di ratti da 6 centri. Inoltre sono stati sottoposti a necroscopia ed analisi parassitologiche e batteriologiche 45 carcasse di topi e 10 di ratti. I test sierologici sono stati effettuati tramite tecnica ELISA indiretta utilizzando in parte kit allestiti nei nostri laboratori ed in parte quelli disponibili in commercio.

Nei sieri di topo e di ratto sono stati ricercati anticorpi contro il reovirus tipo 3, i parvovirus (MVM, H-1), il virus della polmonite murina (PVM), il virus dell'encefalomielite (TMEV), il Sendai virus (SV) e il *Micoplasma pulmonis*; nei sieri di topo sono stati ricercati anche anticorpi contro il virus dell'epatite murina (MHV), il virus della coriomeningite linfocitica (LCMV), dell'ectromelia e della diarrea neonatale (EDIM); nei sieri di ratto sono stati cercati anticorpi contro il virus della sialodacrioadenite (SDAV).

La ricerca del genoma del virus dell'epatite murina è stata fatta utilizzando una nested-PCR (3), su 25 campioni di fegato e 30 di feci di topi.

Per l'identificazione di *Corynebacterium bovis,* agente della dermatite ipercheratosica nel topo nudo, è stato eseguito un esame batteriologico specifico con tipizzazione biochimica.

RISULTATI

Nei topi, il patogeno con la più alta percentuale di campioni positivi è *M. pulmonis*, con 6 conferenti positivi su 12, seguito da MHV con una percentuale del 36,6% e 10 centri positivi su 13; le percentuali di positivi sono riportate in tabella 1. I campioni positivi per il reovirus 3 e per il PVM provengono da un unico centro.

La ricerca del genoma virale dell'MHV ha rilevato 2 campioni di fegati positivi su 25 e 3 in 30 di feci.

Tab. 1: Percentuali di campioni positivi sui testati nei topi.

Patogeno	% positivi	Sieri testati
M. pulmonis	43,5%	108
MHV	36,6%	292
TMEV	7,1%	239
SV	5,5%	274
MVM	5,2%	210
PVM	1,2%	256
Reo 3	1,2%	256
EDIM	0%	125
LCM	0%	19
Ectromelia	0%	19

Inoltre da 6 carcasse di topi atimici nudi provenienti da un unico centro e che presentavano dermatite è stato isolato *Corynebacterium bovis.*

Da 7 tamponi eseguiti su carcasse di animali con lesioni dermatologiche provenienti da 2 conferenti, sono stati identificati *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

All'esame parassitologico diretto e con flottazione delle feci sono stati identificati in 10 campioni su 51, uova e adulti di ossiuridi, in particolare di *Aspicularis tetraptera*. Uova di pidocchi sono state identificate su 4 topi appartenenti a 2 centri di ricerca differenti.

Nei ratti, la percentuale più alta di positivi è per il micoplasma, presente in 5 centri su 6. I risultati dei test per la ricerca di anticorpi contro gli altri patogeni sono riportati in tabella 2.

Tab. 2: Percentuali di campioni positivi sui testati nei ratti.

Patogeno	% positivi	Sieri testati
M. pulmonis	53,7%	136
TMEV	27,7%	65
H-1	5,2%	77
Reo 3	2,2%	137

Anticorpi per il reovirus 3 sono presenti in campioni provenienti da un unico conferimento mentre i campioni positivi al TMEV giungono da 3 centri.
Nei sieri di ratti non sono stati rilevati anticorpi per Sendai virus, PVM, SDAV e LCMV benché siano stati ricercati rispettivamente in 169, 169, 141 e 33 campioni.

DISCUSSIONE

I nostri dati indicano che, benché molti patogeni siano stati eliminati o sussistano con prevalenze molto basse, ci sono alcuni patogeni che circolano attivamente nei centri di ricerca e sperimentazione. Nei topi le infezioni che abbiamo riscontrato con la maggiore frequenza sono quella da *M. pulmonis*, da MHV, dal virus dell'encefalomielite, dal Sendai virus e dal parvovirus. Nei ratti il *M. pulmonis* ha la prevalenza più alta, seguito dal virus dell'encefalomielite dal parvovirus (H-1) e dal reovirus tipo 3. Tra gli allevamenti sierologicamente positivi, in un solo caso era presente sintomatologia clinica. E' noto infatti che gli agenti infettivi più presenti nelle colonie di topi e ratti da laboratorio, sono quelli che sostengono infezioni subcliniche.
Questi dati molto probabilmente forniscono una prevalenza sovrastimata delle infezioni poiché provengono da un numero poco significativo di colonie, alcune poi, con infezioni endemiche, e soprattutto da casi con sospetti clinici di malattia. Risulta quindi impossibile fare un confronto con altri dati di prevalenza pubblicati, ma si possono avere utili indicazioni sui patogeni da monitorare.
L'identificazione del *Corynebacterium bovis,* di ecto ed endoparassiti suggerisce un insufficiente applicazione delle regole di biosicurezza laddove le misure di prevenzione dovrebbe essere una prassi consolidata.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1) Baker D.G. 1998. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. Clinical Microbiology Reviews 11: 231-266.
2) FELASA Working group on health monitoring of rodent and rabbit colonies: Nicklas W., Baneux P., Boot R., Decelle T., Deeny A.A., Fumanelli M., Illgen-Wilcke B. 2002. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental unit. Lab. Animal 36: 20-42.
3) Casebolt D.B., Qian B., Stephensen C.B. 1997. Detection of enterotropic Mouse Hepatitis Virus fecal excretion by Polymerase Chain Reaction. Lab. Anim. Sci. 47: 6-10.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Micaela Ricca e Davide Arienti per la preziosa collaborazione tecnica.

INTERAZIONE TRA PROTEINA PRIONICA PRPC E LA SUA ISOFORMA TRASFORMATA PRPSC IN OVINI DI RAZZA SARDA

[1]Balzano F., [2] Fresu S., [2] Basagni M., [3] Marongiu A. and [1] Zedda M.

[1]Dipartimento di Biologia Animale sez. Anatomia, Università degli Studi di Sassari via Vienna 2, Sassari; [2] PRION DIAGNOSTICA srl, Porto Conte, Fraz. Tramariglio, 07041, Alghero (SS); [3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via Duca degli Abruzzi, Sassari.

Keywords: Prion disease; Fourier-Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy

ABSTRACT

The conversion mechanism of the normal prion protein (PrP^C) into aggregates of its pathological conformer (PrP^{Sc}) remains unclear. The aim of this study was to evaluate the effects induced by exposure of biological samples containing PrP^{SC} to a mesoporose film. The results show that the strong interaction induced molecular changes of samples indicated by the IR spectra located in the region of the absorption of amides. This finding suggests the existence of a strong interaction among the PrP^{sc} , PrP^c and other proteins.

INTRODUZIONE

E' noto che i prioni (PrP^{sc}), agenti infettivi privi di acidi nucleici, si accumulano nelle terminazioni nervose presenti negli organi linfatici, che ne rappresentano quindi un serbatoio (1, 2). Attraverso le fibre nervose, i prioni invadono il sistema nervoso centrale e, replicando nelle cellule neuronali, causano eventi neurodegenerativi che determinano demenza rapida e progressiva, disfunzioni motorie e degenerazione spongiforme del tessuto nervoso cerebrale. Caratteristica di queste patologie è infatti l'accumulo, nel sistema nervoso centrale, di placche amiloidi contenenti grandi quantità di proteine prioniche (2). Le patologie da prione, note come Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE), rappresentano un gruppo di malattie neurodegenerative con esito spesso letale che includono la malattia di Creutzfeldt–Jakob nell'uomo, le encefalopatie spongiformi bovine (BSE) nei bovini e la scrapie negli ovini (2,3). Obiettivo di questo lavoro è stato indagare le interazioni della proteina PrP^c normalmente presente nelle membrane biologiche del neurone con la sua isoforma trasformata PrP^{sc},
utilizzando come supporto alcuni materiali nanostrutturati come film mesoporosi di silice.

MATERIALI E METODI

I campioni biologici provenivano da due ovini sani (soggetti negativi) e da due ovini affetti da Scrapie (soggetti positivi) sono stati preparati sospendendo 5 mg di omogenato di encefalo in 10 ml di Phosphate Buffered Saline (PBS, 1x). I film mesoporosi nanostrutturati di ossido di silicio sono stati preparati presso i laboratori di Scienza dei Materiali e Nanotecnologie del'Univerità degli Studi di Sassari diretto dal Professor Plinio Innocenzi.

Trattamento dei campioni biologici

I campioni biologici positivi sono stati omogenati e successivamente incubati a temperatura refrigerata 2C° e mantenuti in agitazione per 12 ore a contatto con i film nanostrutturati. Dopo incubazione, i film sono stati essiccati in stufa a 60 °C per una notte. I film essiccati sono stati successivamente analizzati mediante spettrometria infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR). Gli spettri IR sono stati acquisiti nel range tra 4000 e 400 cm^{-1} ed elaborati con OPUS 6.0 ed Origin Pro 8. Successivamente i film cosi preparati sono stati reincubati in con omogenati di encefalo ovino sia negativi che positivi seguendo le stesse modalità esposte nei materiali e metodi.

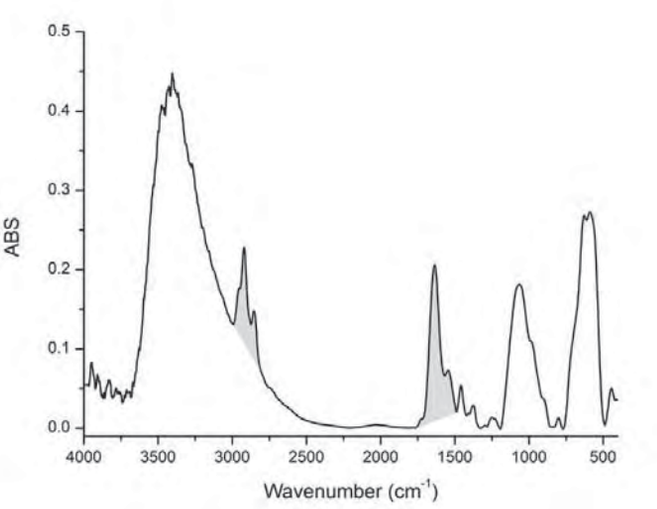
Caratterizzazione dei campioni

Gli spettri ottenuti dai film essiccati dopo la seconda incubazione sono stati analizzati e confrontati con gli spettri della prima incubazione per valutare variazioni nel numero d'onda relativi alla interazione proteina proteina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi mediante FT-IR è una tecnica utilizzata per rilevare specifiche informazioni biochimiche relative a proteine distribuite in diversi tessuti (4). Nella Fig. 1 è riportato uno spettro FT-IR ottenuto dall'analisi eseguita su campioni positivi e negativi, incubati su materiali nanostrutturati. Le bande di assorbimento corrispondono alle vibrazioni dei differenti gruppi funzionali contenuti nelle proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici presenti nel campione. In particolare, le bande di maggiore interesse, evidenziate nell'immagine, risultano quelle comprese tra 3000 e 2838 cm^{-1}, relative agli stretching vibrazionali dei gruppi CH_2 e CH_3, e quelle tra 1750 e 1480 cm^{-1}, relative all' assorbimento delle ammidi I e II delle proteine (4).

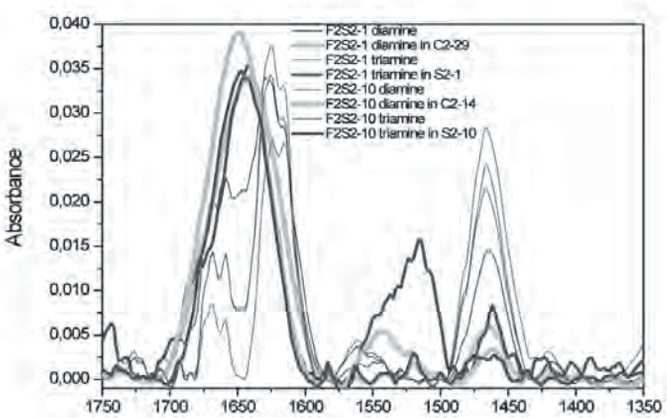
Fig. 1: spettro FT-IR ottenuto dall'analisi di omogenati di encefalo ovino incubati con materiali nanostrutturati



I risultati ottenuti hanno messo in evidenza delle differenze sostanziali tra gli spettri dei campioni analizzati nella prima e nella seconda incubazione, soprattutto nella regione corrispondente alle ammidi (1750-1480 cm^{-1}).
Come rappresentato in Fig. 2, gli spettri IR dei campioni della prima incubazione (linee nere sottili) mostrano la banda

di assorbimento dell'ammide I a 1620 cm^{-1} e una bassa e slargata banda dell'ammide II a 1530 cm^{-1}. Il trattamento di questi campioni (film incubati con omogenati di encefalo positivi) con la seconda incubazione con campioni provenienti da altri animali sia positivi che negativi produce delle modifiche degli spettri di assorbimento (linee nere e grigie grosse) con uno shift della banda dell'ammide I a 1650 cm^{-1} e del picco dell'ammide II a 155 cm^{-1}. Il profilo degli spettri dei campioni trattati nella seconda incubazione non è più sovrapponibile allo spettro della prima incubazione (linee nere sottili) riportati come termine di confronto.

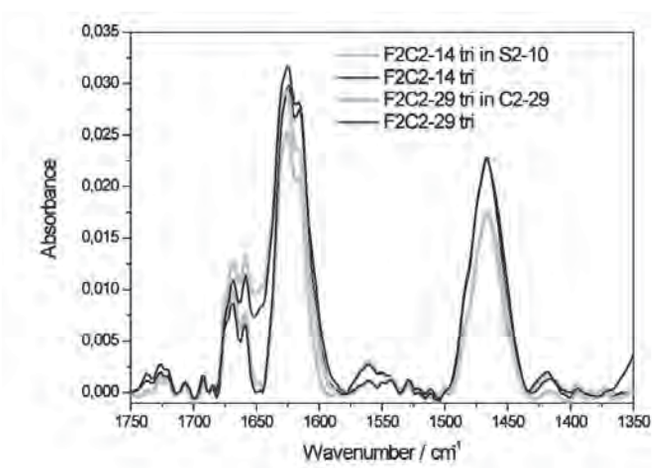
Fig. 2: spettri IR di campioni positivi (linee nera)reincubati in campioni sia negativi che positivi (linee grige).



Tali risultati sono stati confermati su un campione positivo proveniente da un altro animale, sottoposto allo stesso trattamento. Anche in questo caso, gli spettri IR dei campioni alla seconda incubazione (linee grigie) mostrano la banda dell'ammide I a 1620 cm^{-1} e una bassa e slargata banda dell'ammide II a 1540 cm^{-1}. anche in questo caso produce uno shift della banda dell'ammide I a 1650 cm^{-1} e del picco dell'ammide II a 1550 cm^{-1} (Fig. 3), simile allo spettro del campione utilizzato come confronto. Per verificare il metodo, i film sono stati preparati anche utilizzando come prima incubazione il campione negativo, e poi nelle seconde incubazioni, i negativi ed i positivi. In questo caso, non si evincono spostamenti nel numero d'onda. Questo dimostra che il film non viene usurato durante la seconda incubazione.

Fig. 3: spettri IR di campioni negativi (linee nere) reincubati con campioni sia negativi che positivi (linee grigie).

Il cambiamento nel numero d'onda riscontrato nelle seconde incubazioni dei campioni a contatto con i film positivi rispetto a quelli incubati in film negativi dimostra una straordinaria interazione tra la proteina PrP^{sc} e la PrP^{c}. sulla base di questa evidenza si può ipotizzare l'utilizzo della stessa proteina come ligando nella preparazione di kit diagnostici, ed apre nuove ipotesi sulle capacità della stessa proteina trasformata di legare la stessa proteina, ma anche proteine diverse contenute nell'omogenato. Questa suggestiva ipotesi trova conferma nella mancata reazione nei film negativi che non interagiscono in maniera evidente neanche se incubati in omogenati positivi. Questi esperimenti suggeriscono che anche la proteinasi k potrebbe essere inattivata dalla PrP^{sc} in questo modo, e per questo motivo inefficace nel processo di digestione. Questi risultati preliminari, se ulteriormente confermati, contribuiscono a supportare in maniera indiretta la teoria formulata nel lavoro presentato al convegno SIDiLV del 2008, di una interazione forte di tipo fisico (legame magnetico) tra la PrP^{sc} e PrP^{c} e forse anche con altre proteine.



RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Prof. Plinio Innocenzi, il Prof. Vittorio Farina il Dott. Ciriaco Ligios, la Dott.ssa Cinzia Santucciu, Dott.ssa Maria Giovanna Tilocca.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

(1) Hicks MR, Gill AC, Bath IK, Rullay AK, Sylvester ID, Crout DH, Pinheiro TJT. 2006. Synthesis and structural characterization of a mimetic membrane-anchored prion protein. FEBS Journal. 273:1285–99

(2) Prusiner SB. 1998. Prions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA.; 95:13363-83

(3) Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. 1993. Conversion of α−helices into β-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 90:10962–66

(4) Kneipp J, Beekes M, Larsch P. Naummann D. 2002. Molecular changes of preclinical scrapie can be detected by infrared spectroscopy. Journal of Neuroscience. 22(8): 2989-97

STUDIO SULLA PRESENZA DI STAFILOCOCCHI METICILLINO-RESISTENTI IN ANIMALI D'AFFEZIONE

Rossi F.[1], Zoppi S.[1], Bergagna S.[1], Gallina S.[2], Bianchi D.M.[2], Ghiso L.[3], Cagnasso A.[3], Fulghesu L.[1], Goria M.[1], Dondo A.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;
[2]N.R.L. Stafilococchi coagulasi positivi compreso S. aureus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta,Torino;
[3]Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino, Grugliasco

Keywords: *S. aureus* – *S. intermedius* – methicillin resistance – dog

INTRODUZIONE

Gli stafilococchi sono microrganismi commensali e se ne riscontra normalmente la presenza a livello cutaneo e a carico delle prime vie respiratorie anche in soggetti in buona salute. In ambito umano, l'abbattimento delle difese immunitarie o l'indebolimento dello strato lipidico protettivo della cute può portare alla colonizzazione di questi batteri e in particolare, *S. aureus* può causare patologie di varia gravità, quali piodermiti, mastiti, o in caso di infezioni nosocomiali, può portare alla suppurazione di ferite chirurgiche e talvolta a forme di setticemia.
In campo veterinario, questi batteri possono essere soprattutto fonte di perdite economiche, anche ingenti, in ambito zootecnico, ma non di rado si assiste alla comparsa di patologia stafilococcica (1,2,3) negli animali da compagnia (piodermiti, setticemia).
Negli ultimi anni si è assistito alla comparsa di ceppi di *S. aureus* che hanno sviluppato una resistenza nei confronti della meticillina, molecola d'elezione in medicina umana per la terapia delle infezioni stafilococciche. Tale proprietà è legata alla capacità dei microrganismi stessi di produrre una particolare Penicillin Binding Protein modificata, detta PBP2a, codificata dal gene mec-A, con una scarsa affinità per gli antibiotici betalattamici, cefalosporine incluse.
Questo meccanismo è quindi responsabile di fallimenti terapeutici, guarigioni incomplete, ricadute e recrudescenze dei processi infettivi. Gli stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA) pertanto sono oggetto di forte interesse per la medicina umana per la loro crescente diffusione a livello mondiale. Da qualche tempo di assiste anche allo studio dei ceppi circolanti negli animali per i possibili risvolti zoonosici, facilitati da uno stretto contatto dell'uomo con gli animali da compagnia.
Questo studio vuole quindi contribuire alla ricerca della eventuale presenza di ceppi meticillino-resistenti di stafilococchi circolanti nella popolazione canina, valutando, nel contesto del campione considerato, anche il significato diagnostico legato a tale riscontro.

MATERIALI E METODI

Campionamento – Nel periodo compreso tra il 01/06/08 e il 31/05/09, sono stati collezionati ed analizzati n. 380 campioni prelevati da n. 100 cani come riportato in Tabella n. 1.

Tabella n. 1: Suddivisione dei campioni analizzati

n. cani analizzati		n. campioni
in vita	28	95 tamponi cute
post mortem	72	285 organi
totale	100	380

I tamponi cutanei sono stati prelevati da animali in vita presso l'Ospedale Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino e sono stati prelevati indistintamente da cani che presentavano o no lesioni a carico della cute.
Il campionamento prevedeva l'esecuzione di tamponi a partire da cute della loggia ascellare, cavità nasale, spazi intergiditali, padiglione auricolare e, se presenti da lesioni purulente e da ascessi.
Gli animali morti provenivano dall'attività di routine dell'Istituto Zooprofillattico della sede di Torino.
Accertamenti batteriologici su tamponi cutanei – La determinazione della meticillino-resistenza è stata effettuata fenotipicamente, come fase di screening, mediante l'utilizzo del terreno cromogeno MRSA Brilliance (Oxoid) contemporaneamente alla fase di allestimento delle colture primarie su Agar Sangue e RPF Agar.
Accertamenti batteriologici su animali morti – A partire da differenti organi (fegato, milza, polmone e midollo osseo) sono state allestite colture primarie. Nel caso di crescita riferibile a *Staphylococcus* spp., si è proseguito con l'identificazione del ceppo.
Su tutti i ceppi di *Staphylococcus aureus* e *S. intermedius* identificati, è stato allestito l'antibiogramma secondo metodo di Kirby-Bauer utilizzando un dischetto contenente cefoxitina alla concentrazione di 30 µg secondo le linee guida CLSI. Contestualmente il ceppo veniva trapiantato su terreno cromogeno MRSA Brilliance (Oxoid).
Analisi genetica sui ceppi per meticillino-resistenza – Analisi genetica sui ceppi per meticillino resistenza:
E' stato effettuato uno screening per la presenza del gene di resistenza alla meticillina mecA mediante analisi PCR su 34 ceppi di *S.aureus* e *S.intermedius*.
L'amplificazione del gene mec A è stata ottenuta con i primers MecA147-F (5'-GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT-3' e MecA147-R (5'-ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T-3') che generano un amplicone di 147 pb secondo quanto descritto in letteratura (5).

Tabella n. 2: Suddivisione degli isolati batterici appartenenti al genere Staphylococcus per specie e origine.

CEPPO ISOLATO	n. ceppi	Isolamento da CUTE	Isolamento da ORGANO
S. AUREUS	10	9	1
S. INTERMED.	24	17	7
S. WARNERI	1	1	-
S. SCHLEIFERI	3	3	-
S. XYLOSUS	1	1	-
S. SAPROPH.	1	1	-
TOTALE	40	32	8

5 µl di DNA, precedentemente estratto dalle colonie mediante bollitura, sono stati aggiunti a 20µl della miscela di reazione [(50mM KCl, 20 mMTris-HCl (pH8,4), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTPs e 1 U di Taq polimerasi Platinum (Invitrogen)] e successivamente amplificati alle seguenti condizioni: 94°C per 2'; (94°C per 1', 50°C per 1', 72°C per 2') per 30 cicli; estensione finale a 72°C per 10'.
I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di Agarosio (2%).

RISULTATI
Come riportato in Tabella n. 2, sono stati isolati n. 24 ceppi di *S. intermedius,* n. 10 ceppi di *S. aureus* e n. 6 ceppi appartenenti ad altre specie.
Mediante esecuzione dei test di screening batteriologici (terreno cromogeno) e biomolecolari (gene mec A) precedentemente descritti, sono stati identificati come meticillino-resistenti n. 8 su 34 ceppi: n. 7 *S. aureus* e n. 1 *S. intermedius*. Da segnalare che tutti i ceppi non hanno mostrato sensibilità fenotipica alla cefoxitina.
In particolare, il singolo isolamento di *S. intermedius* è avvenuto a partire da tamponi auricolari eseguiti a livello ambulatoriale su un cane che presentava alla visita dermatologica una forma recidivante di otite purulenta refrattaria a trattamenti terapeutici eseguiti in precedenza.
Uno dei 7 ceppi di *S. aureus* era stato isolato da un cucciolo di pochi giorni di vita proveniente da una cucciolata che presentava un tasso di mortalità pari al 50%. All'esame necroscopico presentava ascessi cutanei multipli e marcata splenomegalia, indici di forma setticemica, confermata dall'isolamento di *S. aureus*.
I restanti 6 ceppi di *S. aureus* erano stati isolati invece da un unico animale di circa due anni affetto da una forma diffusa di piodermite. L'isolamento è avvenuto a partire da tamponi cutanei eseguiti in sede ambulatoriale nei differenti punti di repere stabiliti a priori (loggia ascellare, cavità nasale, spazi intergiditali, padiglione auricolare) e da una formazione ascessuale. È evidente che il ceppo di *S. aureus* era stato in grado di colonizzare differenti distretti cutanei.

DISCUSSIONE
Lo studio preliminare descritto ha già permesso di evidenziare n. 2 casi di infezione da *S. aureus* meticillino-resistenti in due cani. Contestualmente, viene segnalata la presenza di un ceppo di *S. intermedius* che presenta caratteristiche fenotipiche e genotipiche assimilabili agli MRSA.
In accordo con altri studi condotti (2), è stato possibile osservare nel cane, la presenza di ceppi di *S. intermedius* meticillino-resistenti., comunemente associati a infezioni cutanee superficiali, mentre il riscontro di *S. schleiferi*, nel nostro studio, era riconducibile esclusivamente a reperto cutaneo occasionale su animali sani.
Il test di screening che utilizza il terreno cromogeno ha dato risultati sovrapponibili a quanto osservato per via genotipica. È significativo e degno di nota che i ceppi risultati portatori di meticillino-resistenza erano in grado di causare patologia di gradi differenti di gravità anche mortali.
Interessante e tuttora da approfondire il dato relativo alla resistenza fenotipica, poiché tutti i ceppi testati non hanno presentato resistenza nei confronti della cefoxitina.
In medicina umana gli studi condotti in merito agli MRSA e le metodiche diagnostiche messe a punto sono numerose , così come risultano numerosi i casi clinici riscontrati soprattutto a livello nosocomiale.
In campo veterinario, in particolare negli ultimi tempi, la presenza di ceppi meticillino-resistenti sta assumendo sempre maggiore importanza anche nell'ottica della messa a punto di metodiche diagnostiche standardizzate mirate alle specifiche esigenze clinico-diagnostiche (2).
Pertanto anche questo studio può essere considerato un contributo volto ad approfondire le conoscenze in tema di meticillino-resistenza.

BIBLIOGRAFIA
1. Duquette RA, Nuttall TJ., 2004. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dogs and cats: an emerging problem?. J Small Anim Pract. 45(12):591-7.
2. Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC., 2006. Screening of Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius, and Staphylococcus schleiferi isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). Vet Dermatol. 2006 Oct;17(5):332-7
3. Rich M., 2005. Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Br J Biomed Sci. 62(2):98-105.
4. Kunyan Zhang, Jo-Ann McClure, Sameer Elsayed, Thomas Louie, and John M. Conly, 2005. Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 43(10):5026-33.

ABSTRACT
Staphylococci form part of the normal flora of man and a wide variety of animals. Some staphylococcal species also cause a wide variety of pyogenic infections. We conducted a study on dogs in order to detect MRSA and MRSI by means of fenotipic (cefoxitin) and genotypic (mec-a) methods. We found methicillin-resistant strains in three dogs with pyogenic infections only with genotypic methods.

Progetto realizzato in parte con il finanziamento del Ministero per la Ricerca Corrente Anno 2007 dal titolo "Sviluppo di protocolli diagnostici integrati e strategie gestionali per il controllo di patologie a carattere zoonosico con particolare riferimento alle micobatteriosi".

ISTAMINA NEI PRODOTTI ITTICI: OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO MEDIANTE HPLC CON RIVELAZIONE FLUORIMETRICA E DERIVATIZZAZIONE CHIMICA POST-COLONNA

Lo Magro S., Iammarino M., Nardiello D., Campaniello M., Muscarella M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Dipartimento di Chimica, Foggia

Key words: istamina, prodotti ittici, HPLC/FLD

SUMMARY
A rapid, sensitive and automated post-column derivatization procedure using *o*-phtalaldehyde and N,N-dimethyl-2- mercaptoethylamine, coupled to ion-pair liquid chromatography and fluorescence detection, is described for the determination of histamine in fresh and processed fish samples. Separation experimental conditions as well as the sample extraction protocol have been carefully evaluated. The proposed method has been submitted to validation procedure to assess accuracy, sensitivity, precision and ruggedness.

INTRODUZIONE

L'istamina (o 2-(4-imidazolil)etilammina) è una ammina biogena, prodotta per decarbossilazione microbica dell'amminoacido L-istidina. Riveste un particolare significato sanitario e tecnologico, sia in relazione ad episodi di intossicazione anafilattoide, sia perché evidenzia il cattivo stato di conservazione dei prodotti ittici. Il contenuto di istamina aumenta in seguito a manipolazioni prolungate o esposizione a temperature elevate, nonché a pratiche antigieniche durante la raccolta, la lavorazione e la distribuzione dei prodotti. Soltanto per l'istamina esistono dei limiti di tollerabilità nei prodotti ittici, poiché è l'unica ammina biogena responsabile di fenomeni di intossicazione (sgombroid poisoning) (1). Il Regolamento 2073/2005/CE definisce i limiti normativi del contenuto di istamina nei prodotti ittici, indicando che il valore medio, valutato su nove campioni prelevati dallo stesso lotto, non deve superare 100 mg/kg; due campioni possono avere un tenore compreso tra 100 e 200 mg/kg; nessun campione deve avere un tenore superiore a 200 mg/kg. Tali limiti si applicano soltanto ai pesci delle famiglie di *Scombridae*, *Clupeidae, Engraulidae* e *Corifaenidae*, che sono tra i più esposti al processo di avvelenamento alimentare per il loro elevato tenore di istidina. Per la determinazione dell'istamina in matrici alimentari sono descritti numerosi metodi analitici, basati sulla gascromatografia, la cromatografia liquida ad alte prestazioni, la cromatografia a scambio ionico e l'elettroforesi capillare (2). La determinazione dell'istamina è comunemente eseguita in HPLC che, a causa delle scarse proprietà spettroscopiche e della assenza di gruppi fluorofori, necessita di processi di derivatizzazione pre o post-colonna. Il cloruro di dansile (Dns) è l'agente derivatizzante più comunemente utilizzato tanto che la separazione dei dansil-derivati è la tecnica di riferimento riportata nel Reg. 2073/2005/CE per la determinazione dell'istamina. Tale metodo, pubblicato da Malle et *al*. (3) e successivamente approfondito da Duflos et *al*. (4) non fornisce una attenta valutazione delle performances analitiche quali precisione, recupero, specificità, sensibilità ed applicabilità del metodo, come richiesto dal Reg. 882/2004/CE. Inoltre, la rivelazione UV richiesta nei processi di derivatizzazione mediante cloruro di dansile non risulta del tutto adeguata come sistema di rivelazione nei metodi di conferma per le analisi di controllo ufficiale, a causa della scarsa selettività. Secondo il Reg. 2073/2005/CE è possibile, comunque, adoperare metodi alternativi validati purché le prestazioni analitiche siano paragonabili a quelle del metodo ufficiale. La presenza del gruppo amminico primario offre la possibilità di derivatizzare l'istamina mediante aggiunta post-colonna di *o*-ftalaldeide (OPA), convertendola in un composto isoindolico fluorescente (5,6). Nel presente lavoro è stato ottimizzato un metodo analitico per la determinazione dell'istamina nei prodotti ittici mediante derivatizzazione post-colonna con OPA e N,N-dimetil-2-mercaptoetilammina (Thiofluor™) abbinata alla cromatografia a coppia ionica e alla rivelazione fluorimetrica. Tale metodo è stato sottoposto a procedura di validazione secondo quanto prescritto nel Reg. 882/2004/CE.

MATERIALI E METODI

5 g di campione sono estratti ed omogeneizzati con 30 mL di acido tricloroacetico (TCA) al 5% mediante ultraturrax (IKA ULTRA-TURRAX® T18 basic - Werke GMBH & Co.). Dopo centrifugazione a 2112 ×g per 10 min a 10°C, l'estratto, portato ad un volume di 30 mL con TCA 5%, viene filtrato su membrane Anotop 10 LC (0.2 µm, Whatman). Prima dell'analisi cromatografica, a 10 µL dell'estratto sono aggiunti 980 µL di acqua e 10 µL di NaOH 1M, controllando che il valore del pH sia uguale a 12 mediante cartina al tornasole.

Apparecchiatura: Cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania) corredato di rivelatore fluorimetrico (modello G1321A) e di un dispositivo automatizzato per la derivatizzazione chimica post-colonna (LabService Analytica Srl, Anzola Emilia, BO, Italia).

Reagenti: Acetonitrile, acqua per HPLC (Baker, Deventer, Olanda); acido tricloroacetico (Carlo Erba, Italia); istamina diidrocloruro (≥ 99%), sodio 1-decansolfonato, potassio fosfato bibasico e potassio fosfato monobasico (Sigma-Aldrich, Germania); *o*-ftalaldeiede, Thiofluor™, tampone diluente potassio borato OD104 (Pickering Laboratories, USA).

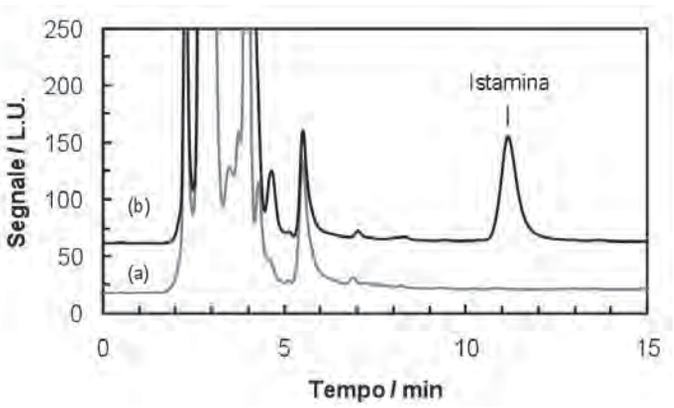
Condizioni cromatografiche: Colonna Phenomenex Luna C8 (250 mm × 4.6mm i.d., dimensione particelle: 5µm). Eluizione isocratica con tampone fosfato, contenente l'agente a coppia ionica (sodio decansolfonato), a pH 5.3 ± 0.1/MeCN (80:20). Flusso: 1.0 mL/min. Flusso di agente derivatizzante: 0.4 mL/min. Temperatura colonna e camera di derivatizzazione: 40 °C. Volume di iniezione: 100 µL. Lunghezza d'onda di eccitazione: 445 nm. Lunghezza d'onda di emissione: 343 nm.

RISULTATI

La metodica analitica per la determinazione dell'istamina previa derivatizzazione post-colonna con OPA e Thiofluor™ è stata ottimizzata sia per la fase di preparazione del campione che per le condizioni di separazione cromatografica. Gli studi sono stati condotti su campioni di tonno in scatola, additivati ad un livello di 100 mg/kg di istamina. Il metodo proposto prevede una fase di estrazione con TCA semplice, veloce e non richiede ulteriori processi di sgrassamento mediante solventi organici, né filtrazione su membrane porose. Al fine di migliorare la riproducibilità del segnale, prima dell'iniezione in colonna, è stato necessario basificare l'estratto del campione. Inoltre sono state individuate le condizioni ottimali di separazione cromatografica, utilizzando

colonne diverse per tipologia di fase stazionaria e variando il pH della fase mobile. Il metodo ottimizzato è stato poi validato in accordo con quanto stabilito dal Reg. 882/2004/CE, valutando le performances analitiche quali specificità, linearità, ripetibilità, recupero, limite di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) e robustezza. In Figura 1 è mostrato il profilo cromatografico di un campione di tonno in scatola, bianco (a) ed additivato (b).

***Figura 1**. Confronto tra un campione di tonno in scatola a) bianco e b) additivato con istamina a 200 mg/kg*



Nella Tabella 1 sono riportati i parametri di calibrazione e i limiti di decisione della metodica ottimizzata. La verifica della linearità è stata effettuata mediante la retta di regressione ottenuta dalla media delle curve di calibrazione registrate in 3 differenti sessioni di lavoro.

***Tabella 1**. Parametri di calibrazione. y: segnale in unità di luminescenza (LU); x: valore della concentrazione in mg/L.*

y = a + bx				
a ± SD	b ± SD	r	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
22 ± 23	3965 ± 68	0.9995	0.019	0.059

Le prove per la valutazione della precisione e del recupero del metodo sono state eseguite in condizioni di ripetibilità, su campioni di tonno in scatola sott'olio, fortificati con istamina a 50, 100 e 200 mg/kg (6 ripetizioni per ogni livello di additivazione). I parametri di validazione ottenuti sono riportati nella Tabella 2. I coefficienti di variazione percentuale (CV%) sperimentali sono stati confrontati con i valori teorici di riferimento ricavati dall'equazione di Horwitz, descritta nella Dec. 657/2002/CE. La selettività del metodo è stata valutata analizzando 20 campioni di pesce fresco e conservato (tonno, sardine, alici fresche e sott'olio). Le prove di robustezza sono state eseguite secondo l'approccio di Youden, definito nella Dec. 657/2002/CE.

***Tabella 2**. Parametri di validazione: ripetibilità e recupero.*

Livello di additivazione	CV%		Recupero
mg/kg	*sperimentale*	*Horwitz*	%
50	4.7	4.4–5.9	84.1±3.9
100	3.7	4.0-5.3	89.8±3.3
200	2.2	1.6-2.2	88.8±1.9

DISCUSSIONE

Il metodo da noi messo a punto, confrontato con il metodo di riferimento indicato nel Reg. 2073/2005/CE per la determinazione dell'istamina, consente di ottenere una maggiore riproducibilità ed affidabilità di analisi, non necessita di alcun controllo della reazione di derivatizzazione e risulta altamente selettivo. Inoltre, a differenza del metodo ufficialmente riconosciuto, i requisiti analitici del metodo proposto sono stati verificati tramite una procedura di validazione condotta integrando quanto specificato nel Reg. 882/2004/CE con i protocolli riportati nella Dec. 657/2002/CE. I valori di ripetibilità rientrano nell'intervallo di riferimento valutato mediante l'equazione di Horwitz, mostrando una precisione in accordo con i criteri ufficialmente riconosciuti. La selettività del metodo ha consentito, insieme alle prove di robustezza, l'applicazione del metodo di analisi a diverse matrici di pesce fresco e conservato.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stato messo a punto e validato un metodo analitico per la determinazione dell'istamina nei prodotti ittici. Tale metodo si basa sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelazione fluorimetrica e derivatizzazione post-colonna mediante OPA e Thiofluor™. Sono state ottimizzate le condizioni sperimentali di separazione cromatografica ed estrazione del campione. Il metodo proposto si è dimostrato semplice, rapido, sensibile e consente di ottenere una elevata riproducibilità di analisi. La valutazione delle prestazioni analitiche, effettuata mediante una procedura di validazione, rispondente ai criteri definiti nel Reg. 882/2004/CE, ha confermato l'affidabilità del metodo nel controllo ufficiale e nella determinazione dell'istamina nei prodotti ittici posti sotto vincolo sanitario.

BIBLIOGRAFIA

1. S.L. Taylor (1986). Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* 17, 91–117.
2. A. Önal (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103 1475-1486.
3. P. Malle, M. Valle, S. Bouquelet (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int*. 79, 43-49.
4. G. Duflos, C. Dervin, P. Malle, S. Bouquelet (1999). Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (Pleuronectes platessa) and whiting (Merlangus merlangus). *J. AOAC Int*. 82, 1097-1101.
5. T. Lavizzari, M.T. Veciana-Nogués, S. Bover-Cid, A. Mariné-Font, M.C. Vidal-Carou (2006). Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1129, 67–72.
6. M.T. Veciana-Nogués, T. Hernández-Jover, A. Mariné-Font, M.C. Vidal-Carou (1995). Liquid Chromatography Method for Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products. *J. AOAC Int*. 78, 1045-1050.

Lavoro eseguito con la collaborazione tecnica di P. D'Antini (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata).

APPLICABILITÀ DEL TEST DI STABILITÀ DEI LISOSOMI IN PESCI D'ACQUA DOLCE E SALATA

Anzalone L., Agnetti F., [1]Tavoloni T., [1]Lestingi C., [2]Susini F., [1]Latini M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione Diagnostica di Terni

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione Diagnostica di Ancona

[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Sezione Diagnostica di Pisa

Key words: lisosomi, stabilità, Rosso Neutro

SUMMARY

Destabilization of lysosomal membranes test is a general biomarker of stress: the Neutral Red (NR) dye retention assay performed on fish hepatocytes can be done with the aim of detect a stress syndrome, both in wild and farmed species. Primary condition for a good success of the test, is the viability of the hepatocytes. In this paper, the application of the NR dye retention assay to rainbow trout and seabass hepatocytes is described. Data obtained show that the assay is a reliable test when used on trout specimens.

INTRODUZIONE

Il biomarker, come viene attualmente definito, è una risposta biologica sub-individuale ad una contaminazione chimica ambientale. Tale risposta, espressione di una deviazione dallo stato fisiologico, può essere misurata nell'organismo animale o in suo prodotto (1,2). I biomarkers, in funzione della specificità di risposta nei confronti di agenti inquinanti, si possono distinguere in specifici e generici. Fanno parte di quelli specifici le risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo a seguito dell'esposizione ad una specifica classe di contaminanti. Si definiscono invece biomarkers generici le risposte molecolari, cellulari e fisiologiche che segnalano l'effetto e/o l'esposizione ad uno o più contaminanti, senza fornirne indicazioni più precise sulla classe; pertanto, la deviazione dallo stato fisiologico può essere attribuita ad un insieme di contaminanti accumulatosi nei tessuti dell'organismo sentinella. A questo secondo gruppo appartengono biomarkers quali la destabilizzazione delle membrane lisosomiali.

I lisosomi sono corpuscoli intracellulari in grado di compartimentalizzare al loro interno una grande quantità di composti tossici, svolgendo un ruolo importante nella loro detossificazione. La stabilità della membrana lisosomiale risulta un indice estremamente sensibile dello stato funzionale delle cellule dell'organismo, strettamente correlato all'insorgenza di situazioni patologiche provocate da metalli pesanti e inquinanti organici. Tale indice, pertanto, è in grado di segnalare l'esistenza di una generica condizione di stress ascrivibile all'insieme dei contaminanti chimici accumulati nei tessuti animali. Un metodo per la misurazione della stabilità della membrana lisosiomale è il test della ritenzione del Rosso Neutro (NR). Il Rosso Neutro è un colorante lipofilico e come tale attraversa facilmente le membrane plasmatica e lisosomiale. Nei lisosomi, a causa del loro pH fortemente acido, passa nella forma dissociata che ne impedisce il ritorno nel citoplasma e lo rende visibile microscopicamente. L'efficienza con cui il NR rimane intrappolato nei lisosomi dipende dal loro pH, ossia dalla funzionalità della pompa protonica (3) presente sulla membrana lisosomiale che trasporta attivamente H^+ dal citoplasma nei lisosomi (4). Eventuali danni alla membrana lisosomiale e possibile inibizione della pompa protonica provocati da inquinanti chimici possono far rilasciare il contenuto lisosomiale nel citoplasma. Essenziale perché questa metodica abbia un valore statistico è recuperare una quantità sufficiente di cellule vitali da un organo bersaglio prescelto.

Questo lavoro analizza la possibilità di utilizzare tale metodica su epatociti di pesci d'acqua dolce e salata, al fine di avere uno standard da impiegare nei test di screening ecotossicologici, per la valutazione dello stress ambientale su specie allevate.

MATERIALI E METODI

Oggetto di studio sono state 20 trote iridea (*Oncoryhnchus mykiss*) e 20 spigole (*Dicentrarchus labrax*) di circa 200 g di peso. Le trote erano allevate in vasche di cemento, mentre le spigole in gabbie galleggianti.

Il test di stabilità lisosomiale è stato eseguito secondo quanto descritto da Ringwood (5). Dopo eutanasia degli animali, si è proceduto al prelievo di una porzione di fegato, al suo trasferimento in piaste petri da 100 mm di diametro, poste in ghiaccio, ed alla disgregazione meccanica con bisturi in soluzione salina libera da calcio e magnesio (CMFS), composta da: 20 mM HEPES (Sigma), 360 mM NaCl, 12,5 mM KCl, 5 mM EDTA (Carlo Erba Reagenti), pH 7,4. Il prodotto così ottenuto è stato trasferito in piastre a 12 pozzetti (fino ad 1,5 ml per pozzetto); per ciascuna aliquota sono stati effettuati due lavaggi con 1 ml di CMSF seguiti da disgregazione enzimatica in collagenasi (Sigma-Aldrich) con 1 mg di collagenasi in 1 ml di soluzione salina libera da magnesio composta da: 20 mM HEPES (Sigma), 480 mM NaCl, 12,5 mM KCl, 5 mM $CaCl_2$ (Carlo Erba Reagenti), pH 7,5 per 25-30' previa agitazione meccanica. La soluzione contenente il tessuto così trattato è stata trasferita in eppendorf da 2 ml con filtro, centrifugata a 1400 rpm per 5' per ottenere una sospensione cellulare ed eliminare il tessuto non disgregato. Dopo centrifugazione, il pellet ottenuto è stato recuperato e lavato due volte con 1ml di CMSF e di nuovo centrifugato a 1400 rpm per 5', per allontanare la collagenasi in eccesso. Dopo recupero del pellet, le cellule sono state risospese in un volume adeguato di CMSF (da 50 a 200 µl). Tale sospensione cellulare è stata miscelata In eppendorf da 1,5 ml con lo stesso volume di una soluzione di Rosso Neutro (Acros Organics) (NR) 0,04 mg/ml, preparata al momento. La soluzione d'uso di NR è stata ottenuta sciogliendo 4 mg di polvere di NR in 1 ml di Dimetilsulfossido (Carlo Erba Reagenti) e diluendo 0,10 ml di tale soluzione madre in 9,90 ml di CMSF. Il campione è stato incubato al buio per 60'–90' a temperatura ambiente. Dopo tale periodo una goccia della sospensione è stata osservata al microscopio ottico. La lettura ha previsto la conta degli epatociti, almeno 50 per campione, discriminando tra quelli in cui erano visibili i lisosomi colorati in rosso come organelli ben definiti all'interno della cellula (cellule stabili) e quelli in cui era presente una colorazione rossa diffusa nel citoplasma (cellule instabili).

Questa metodica non ha permesso di recuperare un numero di epatociti di spigola sufficienti a validare la prova. Per questo motivo una porzione del fegato di tutti i campioni di spigole in esame è stata saggiata con lo stesso metodo, previo aumento del tempo di incubazione con collagenasi (fino a 50'). Parimenti, tale variazione del test è stata applicata anche su alcuni campioni epatici di trota.

Poiché la difficoltà nel reperire gli epatociti delle spigole potrebbe essere dovuta alla maggiore quantità di tessuto adiposo presente rispetto al fegato delle trote, si è controllata la quantità di grasso presente nel fegato tramite la seguente metodica: dai 20 esemplari, sia di trote che di spigole, sono stati fatti 5 pool di fegato, ognuno ottenuto da 4 soggetti. L'estrazione della frazione lipidica dai campioni di fegato è stata effettuata utilizzando un estrattore ASE 200 (Dionex), in condizioni di temperatura e pressione controllata. Prima dell'estrazione i campioni finemente omogeneizzati sono stati mescolati con un agente disperdente (Hydromatix) su piastra Petri in vetro ed essiccati in stufa a 50°C

per circa 12 ore.
I campioni così essiccati sono stati caricati nella cella ASE e sottoposti ad estrazione a temperatura di 100°C e 1500 psi di pressione, utilizzando come solvente una miscela di acetone:esano 1:1 (v:v). Le condizioni operative prevedono una fase iniziale (5') di riscaldamento della cella (HEAT) seguita da un ciclo di estrazione statica della durata di 5' (STATIC) e dal successivo lavaggio con una quantità di solvente fresco pari al 60% di volume della cella (FLUSH%). L'estrazione termina con lo spurgo del solvente per 200'' (PURGE). L'estratto, trasferito in un pallone da 100 ml precedentemente tarato, è stato portato a secco al rotavapor. Dopo completa rimozione del solvente il grasso estratto è stato pesato e la percentuale di grasso estratta è stata determinata mediante la formula:
Percentuale di grasso estratta (L) = (C1/C2) x 100
dove:
C1= quantità complessiva di grasso estratta
C2= quantità di campione tal quale pesata all'inizio della prova.

RISULTATI
I risultati del recupero cellulare di epatociti vitali che quindi intrappolano il rosso neutro in maniera stabile o meno è riportato in tabella 1 e mostrato in figura 1.

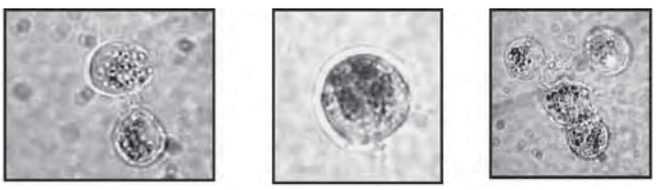
Tabella 1. *Epatociti vitali recuperati*

		Media	Deviazione Standard
TROTE			
	Metodica 1 Tempo collagenasi 25-30'	62,37	17,71
	Metodica 2 Tempo collagenasi 50'	28,33	12,72
SPIGOLE			
	Metodica 1 Tempo collagenasi 25-30'	17,66	6,62
	Metodica 2 Tempo collagenasi 50'	24	14,44

Tabella 2. *Percentuale di grasso epatico*

	% grasso epatico
TROTE	
pool 1	3,0
pool 2	3,6
pool 3	2,9
pool 4	3,5
pool 5	2,6
SPIGOLE	
pool 1	40,3
pool 2	35,0
pool 3	43,1
pool 4	39,5
pool 5	48,2

Figura 1. *Lisosomi stabili e non stabili recuperati*



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
I risultati ottenuti mostrano una evidente facilità di recupero degli epatociti dai fegati di trota quando si utilizza la metodica standard che prevede un tempo di contatto della collagenasi con il fegato per 25-30'. La stessa metodica non ottiene risultati efficaci dai fegati di spigola. La spiegazione dovuta alla diversa consistenza dei due campioni viene evidenziata dalla notevole differenza della presenza di grasso, che risulta notevolmente maggiore nei fegati di spigola. Quest'ultima specie presenta infatti una percentuale di grasso che varia tra il 35% e il 48,2% e che risulta essere mediamente più di 10 volte maggiore a quella delle trote, che varia tra un minimo di 2,6% a un massimo di 3,6%. La metodica modificata, portando il tempo di contatto tra collagenasi e campione fino a 50', evidenzia un miglioramento del recupero di epatociti nelle spigole (24 ± 14,44), pur rimanendo a livelli comunque inferiori a quelli delle trote; tale risultato potrebbe essere dovuto alla presenza diffusa del grasso all'interno del tessuto epatico, che da un lato impedirebbe un'azione efficace della collagenasi, dall'altro sembrerebbe "catturare" gli epatociti impedendone un recupero sufficiente per effettuare il test.
Al tempo stesso, la metodica variata determina un netto calo di recupero nelle trote (28,33 ± 12,72): questo calo è dovuto probabilmente al tempo di azione prolungato della collagenasi che porta a morte gli epatociti stessi.
In conclusione, appare evidente come il metodo standard per il saggio di stabilità lisosomiale sia applicabile nelle trote. Nelle spigole tale test può essere utilizzato con un tempo di azione della collagenasi di 50', ma, ai fini della significatività statistica, si rende comunque necessario aumentare il numero campionario e/o i limiti di confidenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Fossi M. C. Nondestructive Biomarkers in Ecotoxicology. Genetic and Molecular Ecotoxicology. Environmental Health Perspectives 102, Supplement 12, 49-54 (1994)
2. Van der Oost R., Beyer J. and Vermeulen N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13 (2003), pp. 57-149.
3. Segien P.O. Inhibitors of lysosomal function. Meth. Enzymol., 96 (1983):737-765.
4. Ohkuma S., Moriyama Y. and Takano T. Identification and characterisation of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci., 79 (1982): 2758-2762.
5. Ringwood A.H., Conners D.E., Hoguet J. and Ringwood L.A. Lysosomal destabilization assays for estuarine organisms. In Techniques in Aquatic Toxicology, Vol 2 (2005), pp. 287-300.

COSTRUZIONE DI UN SISTEMA MULTI-SCREENING IN PCR REAL TIME APPLICABILE A MATRICI ALIMENTARI PER IL RILEVAMENTO DI SPECIE VEGETALI GM AUTORIZZATE E NON

Gatto F., Paternò A., Marchesi U., Verginelli D., Quarchioni C., Bonini P., Fusco C., Zepparoni A., Ciabatti I., Amaddeo D.
I.Z.S. delle Regioni Lazio e Toscana, Ufficio di staff Biotecnologie, Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca di OGM

Keywords: PCR, OGM, screening

ABSTRACT: Practicability of the analytical control of GM food and feed and detection of unauthorised GMOs are among the most challenging tasks of the European GMO enforcement laboratory. Multi-target screening systems developed against genetic elements commonly introduced in GM plants provide a powerful analytical tool in terms of time and cost-effectiveness and an indirect approach for unauthorised GMO detection in the lack of event-specific methods and reference materials. In this work, a screening system made of 4 real time PCR methods, targeting 4 GM elements (P35S, TNOS, PAT and NPTII), was tested on GM soya, maize, rapeseed, rice, cotton, sugar beet and potato certified reference materials (CRM).

INTRODUZIONE

Le recenti emergenze che hanno investito il settore risiero con in primis l'importazione dagli USA di partite di riso a grano lungo contaminate con la varietà GM non autorizzata "LL601" e, successivamente, la segnalazione da parte di alcuni stati membri, del ritrovamento di varietà di riso GM, anch'esse non autorizzate, in generi alimentari di origine cinese, hanno evidenziato la crescente esposizione del mercato alimentare europeo al rischio di contaminazioni da parte di prodotti biotecnologici non autorizzati nell'Unione Europea, ma commercializzati in altre parti del mondo.
L'assenza di metodi specifici per l'identificazione di questi OGM non autorizzati in UE, unita alla irreperibilità dei materiali di riferimento, rappresenta spesso un ostacolo che impedisce ai laboratori del controllo ufficiale di svolgere attività di monitoraggio mirate alla verifica di tali contaminazioni nelle filiere agroalimentari.
E' tuttavia possibile, dalla letteratura o da database specifici, reperire informazioni sulla composizione del costrutto genico utilizzato per la produzione di OGM anche non autorizzati e definire, per ogni specie vegetale, una strategia volta alla ricerca mirata di un numero di elementi genici in grado di rivelarne la presenza in alimenti e mangimi.
Un sistema di screening efficiente è inoltre uno strumento essenziale per l'ottimizzazione del flusso di lavoro anche nella ricerca di OGM autorizzati, in quanto consente di restringere il campo d'indagine già nei passaggi preliminari del processo analitico, riducendo considerevolmente costi e carichi di lavoro.

MATERIALI E METODI

Materiali di riferimento certificati (CRM):

Estrazione:
Per le farine di mais e soia GM l'estrazione del DNA è stata eseguita con metodica CTAB mentre per cotone, patata, barbabietola e colza è stato utilizzato il DNeasy Plant mini kit (Qiagen). Il DNA estratto è stato quantificato spettrofotometricamente. L'assenza di inibitori di PCR è stata verificata tramite "monitor run" ossia una PCR real time taxon-specifica eseguita su almeno due livelli di concentrazione di ciascun estratto di DNA.

Metodi PCR Real Time:
Tutte le prove sono state eseguite su piattaforma Applied Biosystems ABI 7900HT con il seguente profilo di amplificazione: 50°C 120'', 95°C 600'', [95°C 15'', 60°C 60''] x 45 (acquisizione dati nella fase a 60°C 60'').
La quantità di DNA utilizzata per l'allestimento delle reazioni è stata di 100 ng ad eccezione degli eventi il cui materiale di riferimento era pari al 100% GM per i quali sono stati utilizzati 20 ng totali. I campioni di DNA estratti dalle farine di patata e barbabietola sono stati utilizzati alla concentrazione risultante dall'estrazione.
Metodo di rilevamento del promotore 35S (2): amplicone 82 bp, TaqMan® Universal Master Mix 1X, primers 400 nM, probe 200 nM, volume di reazione 25 µl.
Metodo di rilevamento del terminatore NOS (3): amplicone 104 bp, TaqMan® Buffer A 1X, $MgCl_2$ 4,5 mM, dATP 0,4 mM, dGTP 0,4 mM, dCTP 0,4 mM, dUTP 0,8 mM, AmpliTaq Gold® DNA polymerase 1,25 U, Amp UNG 0,3 U, primers 400 nM, probe 250 nM, volume di reazione 25 µl.
Metodo di rilevamento del gene *pat* (5): amplicone 68 bp, TaqMan® Universal Master Mix 1X, primers 400 nM, probe 200 nM, volume di reazione 25 µl.
Metodo di rilevamento del gene *nptII* (1): amplicone 113 bp, TaqMan® Universal Master Mix 1X, primers 400 nM, probe 200 nM, volume di reazione 25 µl.

Evento	Prod.
Mais	
3272 1%	IRMM*
BT10 100%	CRL*
BT11 1%	IRMM*
BT176 1%	IRMM*
DAS1507 1%	IRMM*
DAS59122 1%	IRMM*
GA21 1%	IRMM*
M863xM810 1%	IRMM*
MIR604 1%	IRMM*
MON810 1%	IRMM*
MON863 1%	IRMM*
MON88017 100%	AOCS*
MON89034 100%	AOCS*
NK603 1%	IRMM*
T25 100%	AOCS§
Colza	
GT73 100%	AOCS^
MS8 100%	AOCS§
RF3 100%	AOCS§

Evento	Prod.
Soia	
A2704 100%	AOCS§
A5547 100%	AOCS§
DP-305423 1%	IRMM*
DP-356043 1%	IRMM*
MON89788 100%	AOCS*
RR 40-3-2 1%	IRMM*
Cotone	
3006x281 100%	IRMM*
LL25 100%	AOCS§
MON1445 100%	AOCS*
MON15985 100%	AOCS*
MON531 100%	AOCS*
Riso	
LL62 100%	AOCS§
Patata	
EH92-527-1 100%	IRMM*
Barbabietola	
RUR H7-1 100%	IRMM*

* Farine § DNA ^ semi

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il sistema di screening proposto prevede l'allestimento di 4 reazioni di PCR real time per il rilevamento di 4 elementi GM:

1. promotore 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore;
2. terminatore NOS del gene della nopalina sintasi di *Agrobacterium tumefaciens*;
3. gene della PPT-acetiltransferasi (pat) derivato da *Streptomyces viridochromogenes*;
4. gene della neomicina fosfotransferasi II di *Escherichia coli* (nptII).

Il sistema è stato testato su 15 CRM del mais, 6 della soia, 5 del cotone, 1 del riso, 3 della colza, 1 della patata e 1 della barbabietola da zucchero, per un totale di 32 CRM (tabella 1).
Impostando il cut-off per la valutazione di una positività

in corrispondenza del Ct = 35,00, i risultati sperimentali ottenuti nelle prove di amplificazione mostrano ampia corrispondenza con quanto atteso in base agli elementi genici presenti nei CRM. Su alcuni CRM sono stati osservati segnali di amplificazione, con Ct elevati, per elementi non presenti nell'evento GM certificato. E' tuttavia documentata la possibile presenza di OGM contaminanti in materiali di riferimento anche certificati (4) e, pertanto, sono state eseguite delle verifiche sui CRM utilizzati nello studio per rivelare l'eventuale presenza di specie vegetali estranee (dati non mostrati).
Il sistema di multi-screening ha mostrato la capacità di dare almeno una positività in 28 dei 32 eventi GM testati. L'assenza di segnali positivi in 2 eventi di soia (DP-305423, MON89788), 1 di colza (GT73) ed 1 di barbabietola da zucchero (RUR H7-1) conferma, in questi eventi di trasformazione, l'assenza degli elementi genici ricercati. Ciò evidenzia la necessità di integrare, in futuro, il sistema con la ricerca di ulteriori elementi genici.
In tabella 2 è schematizzata l'interpretazione di tutti i risultati che possono essere ottenuti nell'applicazione del sistema di multi-screening: risulta da essa evidente la riduzione del carico di lavoro, e di conseguenza dei costi, nella fase di caratterizzazione degli eventi successiva alla fase di screening.

Il presente lavoro dimostra che i metodi PCR real time adottati nel sistema di screening proposto sono in grado di rilevare efficacemente i relativi bersagli genici nella totalità degli eventi GM in cui tali bersagli sono presenti. In un solo caso (promotore 35S su mais DAS1507) il segnale risulta più debole del previsto e pertanto tale fenomeno sarà oggetto di ulteriori investigazioni.
Allo stato attuale delle conoscenze, e delle possibilità tecniche, il sistema di screening proposto può essere adottato in modo proficuo nella ricerca di OGM in matrici vegetali, sia per l'ottimizzazione del flusso di lavoro nel controllo dei requisiti di etichettatura previsti per gli OGM autorizzati, sia per rivelare l'eventuale presenza di OGM non autorizzati, qualora essi contengano gli elementi genici P35S, TNOS, NPTII o PAT.
I limiti del sistema risiedono nella possibilità di ottenere falsi negativi, qualora più eventi GM siano presenti nel campione in analisi, sotto forma di eventi singoli o di eventi "stacked". Per quanto riguarda gli eventi GM ancora non coperti dal sistema di screening proposto, è allo studio una sua integrazione con nuovi metodi in grado di rilevare gli elementi genici maggiormente informativi.

BIBLIOGRAFIA:

1. Cheng Xin Yi, Jun Zhang, Ka Man Chan, Xiao Kun Liu, Yan Hong, 2008 "Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*)" Anal. Bioch. 375:150-152
2. Pauli U, Liniger M, Schrott, Schouwey B, Hubner P, Brodman P, Eugster A (2001) "Quantitative detection of genetically modified soybean and maize: method evaluation in swiss ring trial" Mitt. Lebensm. Hyg. 92: 145-158
3. Permingeat HR, Reggiardo M, Vallejos RH, 2002 "Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR" J. Agric. Food Chem. 50: 4431-4436
4. Waiblinger HU, Boernsen B, Pietsch K. 2008 "A practical approach to screen for authorized and non-authorized genetically modified plants" Poster at 1st Global Conference on GMO analysis, Como
5. Weighardt F, Barbati C, Paoletti C, Maddalena Q, Kay S, De Beuckeleer M, Van den Eede, 2004 "Real-Time Polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 *Zea mays* event" Journal of AOAC Int. 87 (6): 1342-1355

Tabella 1: Risultati prove screening elementi GM

	P35S		NOS		NPTII		PAT	
Sample Name	**Ct**	**A/D**	**Ct**	**A/D**	**Ct**	**A/D**	**Ct**	**A/D**
Mais								
3272 1%	- -	A A	31,31 31,09	A A	- -	A A	- -	A A
BT10 100%	24,33 24,61	A A	23,20 23,35	A A	- -	A A	24,08 24,29	A A
BT11 1%	31,10 28,92	A A	29,97 28,13	A A	- -	A A	31,77 30,21	A A
BT176 1%	31,28 30,99	A A	- -	A A	- -	A A	- -	A A
DAS1507 1%	**35,41** **35,55**	D D	- -	A A	- -	A A	31,50 31,59	A A
DAS59122 1%	32,41 32,00	A A	- -	A A	- -	A A	31,96 31,92	A A
GA21 1%	**36,33** **35,81**	A A	29,03 28,98	A A	- -	A A	**39,26** **40,15**	A A
M863xM810 1%	31,09 31,02	A A	30,78 30,49	A A	29,38 29,03	A A	- -	A A
MIR604 1%	- -	A A	30,74 31,30	A A	- -	A A	**42,05** **41,50**	A A
MON810 1%	31,62 31,71	A A	- -	A A	- -	A A	- -	A A
MON863 1%	31,67 31,79	A A	30,46 30,55	A A	28,80 29,19	A A	**39,10** -	A A
MON88017 100%	25,61 25,52	A A	25,56 25,82	A A	- -	A A	- -	A A
MON89034 100%	26,19 25,78	A A	26,62 25,20	A A	- -	A A	- -	A A
NK603 1%	30,67 30,62	A A	29,70 29,66	A A	- -	A A	- -	A A
T25 100%	23,17 23,66	A A	- -	A A	- **37,72**	A A	23,85 23,91	A A
Soia								
A2704 100%	23,16 22,37	A A	- -	A A	- -	A A	22,74 22,78	A A
A5547 100%	23,24 23,43	A A	- -	A A	- -	A A	22,80 22,88	A A
DP-305423 1%	**35,90** **37,95**	A A	**35,20** **35,84**	A A	- -	A A	- -	A A
DP-356043 1%	29,85 30,03	A A	**36,62** **36,54**	A A	- -	A A	- -	A A
MON89788 100%	**37,16** **37,01**	A A	**36,81** **37,40**	A A	- -	A A	- -	A A
RR 40-3-2 1%	30,92 31,14	A A	29,29 29,13	A A	- -	A A	- -	A A
Cotone								
LL25 100%	24,86 25,15	A A	24,15 24,13	A A	- -	A A	- **39,35**	A A
MON1445 100%	26,68 26,69	A A	26,18 26,17	A A	24,25 24,29	A A	- -	A A
MON531 100%	23,96 24,34	A A	24,99 25,04	A A	23,35 23,33	A A	- -	A A
3006x281 100%	- -	A A	- **38,59**	A A	**36,91** **36,96**	A A	24,63 24,83	A A
MON15985 100%	23,37 23,62	A A	23,44 23,44	A A	23,47 23,31	A A	- -	A A
Riso								
LL62 100%	24,82 25,00	A A	- -	A A	- -	A A	- -	A A
Colza								
GT73 100%	**37,04** **37,87**	A A	- -	A A	- -	A A	**38,76** -	A A
MS8 100%	**38,51** **37,71**	A A	22,46 22,45	A A	**37,74** -	A A	- -	A A
RF3 100%	**36,17** **35,98**	A A	21,08 21,23	A A	**37,47** **36,74**	A A	- -	A A
Patata								
EH92-527-1 100%	- -	A A	24,07 23,90	A A	22,27 21,94	A A	- -	A A
Barbabietola								
RUR H7-1 100%	- -	A A	- -	A A	- -	A A	- -	A A

Legenda: A = Accordo con i dati di sequenza dell'evento; D = Disaccordo con i dati di sequenza; - = assenza di curve di amplificazione
Nota: l'esito corrispondente a Ct > 35, evidenziato in grassetto, è stato considerato negativo

Tabella 2

Risultati				Possibile presenza di						
P35S	T-Nos	nptII	pat	Soia	Mais	Riso	Colza	Cotone	Barbabietola	Patata
+	+	+	-		MON863, M863xM810			MON1445, MON531, MON15985		
+	+	-	+		BT10, BT11					
+	+	-	-	RR-40-3-2	MON89034, MON88017, NK603			LL25		
+	-	-	+	A2704, A5547	DAS1507, DAS59122, T25					
+	-	-	-	DP-356043	BT176, MON810	LL62				
-	+	+	-							EH92
-	+	-	-		GA21, MIR604, 3272		MS8, RF3			
-	-	-	+					3006x281		
-	-	-	-	MON89788, DP-305423			GT73		H7-1	

NB: Le combinazioni di risultati non riportate in tabella non corrispondono a nessun evento di trasformazione tra quelli esaminati nel presente studio.

Il lavoro presentato è stato realizzato nell'ambito del progetto di ricerca corrente "Monitoraggio di OGM non autorizzati all'importazione: costruzione di un sistema di screening in PCR applicabile a materie prime alimentari vegetali diverse da soia e mais" (IZSLT 01/06 RC) finanziato dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

L'ESAME NECROSCOPICO COME SCREENING PER LA DIAGNOSI DI AVVELENAMENTO ACUTO NEGLI ANIMALI: CORRELAZIONI TRA QUADRI ANATOMO-PATOLOGICI E DETERMINAZIONI TOSSICOLOGICHE

Zoppi S., Bergagna S., Rossi F., Grattarola C., Abete M.C., Capra P., Dondo A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Keywords: poisoning – pet – pigeons

INTRODUZIONE

In ottemperanza a quanto previsto dall'Ordinanza Ministeriale del 18 dicembre 2008, entrata in vigore il 17 gennaio 2009, con pubblicazione su Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 13, è compito istituzionale per la rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali di procedere all'esame necroscopico degli animali ritrovati morti per sospetto avvelenamento, sul territorio di competenza, siano essi di proprietà, sinantropi o selvatici. Parimenti, in caso di ritrovamento di esche avvelenate, queste devono essere conferite al laboratorio per l'analisi tossicologica.
A partire dal 2007 è stato potenziato presso l'IZS PLVA un servizio per la diagnosi tossicologica.
L'obiettivo del presente studio è quello di presentare i dati dell'attività e comparare il quadro anatomo-patologico con il riscontro di positività all'esame tossicologico di animali rinvenuti morti, al fine di fornire dati utili per la diagnosi differenziale nelle forme di avvelenamento acuto.

MATERIALI E METODI

Campionamento – Sono stati presi in considerazione n. 146 animali (cani, gatti, volpi e volatili sinantropi) pervenuti presso i nostri laboratori durante il periodo compreso tra il 1° Gennaio 2007 e il 31 Maggio 2009, con il sospetto di avvelenamento e contestualmente n. 48 esche per un totale di n. 194 campioni. In questo studio, esclusivamente i campioni positivi all'esame tossicologico sono stati presi in considerazione.
Esame anatomo-patologico – Tutti gli animali sono stati sottoposti all'esame necroscopico, indicando gli organi colpiti e la tipologia di lesione riscontrata.
Esame tossicologico – Da ogni animale è stato prelevato il contenuto gastrico, qualora presente, e in modo sistematico una porzione di fegato e di rene da sottoporre ad esame tossicologico. La ricerca tossicologica prevedeva l'esecuzione sui reperti, estratti con opportuno solvente organico, di due determinazioni multiresiduali, eseguite con tecniche di spettrometria di massa accoppiata alla gascromatrografia (tecnica GC-MS) ed alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (tecnica LC-MS/MS). I due esami forniscono in maniera complementare informazioni circa la presenza di un pannello di sostanze (rodenticidi anticoagulanti, stricnina , metaldeide, cloralosio, pesticidi di varie classi) inizialmente stabilito dalla letteratura in materia e arricchito nel tempo grazie all'esperienza acquisita.
Diagnosi differenziale – Qualora presenti lesioni compatibili con patologie a carattere infettivo, sono state eseguite indagini collaterali mirate all'individuazione di agenti virali e batterici causa di sindromi enteriche e nel caso di volatili sinantropi, patologie virali a carattere epidemico.

RISULTATI

È stata riscontrata positività alle prove tossicologiche su 86 animali su 146 come riportato in Tabella n. 1. Confrontando i dati relativi all'esame tossicologico condotto sugli animali con quelli eseguiti sulle esche, si può osservare che la percentuale di positività è superiore a partire dalla carcassa *in toto*. Infatti su 48 esche esaminate, la positività rilevata era del 35,4%.
Normalmente, tutti gli animali sottoposti ad esame necroscopico si presentavano in buone condizioni generali e la morte era sempre sopraggiunta improvvisamente, talora preceduta da vomito e diarrea.
I quadri anatomo-patologici osservati erano riferibili principalmente, ma non esclusivamente, a coagulopatie (38%), mentre nel 19% dei casi non è stato possibile apprezzare lesioni a carico degli organi.

Tabella n. 1: campioni positivi all'esame tossicologico presso i laboratori della Sede di Torino.

TIPO CAMPIONE		N. CAMPIONI POSITIVI	% POSITIVI
ANIMALE MORTO	CANE	55/99	55,6%
	GATTO	13/25	52,0%
	VOLATILI SINANTROPI	13/17	76,5%
	VOLPI	5/5	100,0%
TOTALE		86/146	58,9%

Tabella n. 2: positività per classe di veleno riscontrata sugli animali esaminati.

CLASSE VELENO	N. CAMPIONI POSITIVI	POSITIVITA' (%)
RODENTICIDI	70	81,4%
RODENTICIDI+ MOLLUSCHICIDI	1	1,2%
RODENTICIDI+ INSETTICIDI	4	4,7%
INSETTICIDI	9	10,5%
MOLLUSCHICIDI	2	2,3%
TOTALE	86	100,0%

L'esame necroscopico degli animali positivi all'esame tossicologico, ha evidenziato lesioni principalmente a carico del tratto gastroenterico (66%), pancreas (21%), timo (20%), e nel 5% dei casi erano apprezzabili esclusivamente lesioni a carico di altri distretti anatomici (fegato, polmoni). Solo in alcuni casi è stato possibile osservare a livello gastrico la presenza dell'esca ancora integra (26%). Tale reperto era evidente nel caso di avvelenamento da metaldeide con la presenza costante di pigmentazione anomala del contenuto gastrico e/o intestinale e nel caso di avvelenamento di volatili sinantropi dove era invece evidente una cospicua quantità di granaglie, talvolta colorate, a livello di gozzo e stomaco.
In particolare, facendo riferimento a questo ultimo caso, non venivano osservate lesioni macroscopiche particolarmente evidenti, ma era costante il rinvenimento a livello dell'apparato gastroenterico di contenuto anomalo.
Le sostanze tossiche rilevate appartengono principalmente alla classe dei rodenticidi, seguiti degli insetticidi (organofosforici, carbamati e organoclorurati) e dei molluschicidi (metaldeide) come rappresentato in Tabella n. 2.
Si segnala il rilevamento di methomyl in n. 2 cani e un gruppo di volatili sinantropi.

DISCUSSIONE

La presenza nell'ambiente di bocconi ed esche contenenti veleni o sostanze nocive costituisce un grave rischio per la salute dell'uomo, degli animali e per l'ambiente (1,2).
La loro immissione nell'ambiente rappresenta, inoltre, una continua fonte di rischio non solo confinabile al mondo agricolo-rurale, ma possibile anche nell'ambiente urbano, dove i casi di intossicazione non sono del tutto infrequenti e sono principalmente di natura dolosa a carico di animali d'affezione e sinantropi (3).
In questo studio, la classe di sostanze per cui è stata riscontrata principalmente positività è quella dei rodenticidi, e in particolare degli anticoagulanti di seconda generazione (coumatetralyl, brodifacoum e bromadiolone) poiché rappresentano oggi lo strumento più utilizzato in corso di derattizzazione in quanto estremamente efficaci a fronte di piccole quantità di esca.
La loro facile reperibilità sul mercato, li rende quindi idonei anche ad utilizzi dolosi, quali l'avvelenamento e l'uccisione di volatili sinantropi, cani e gatti.
Diversamente da quanto descritto in bibliografia (4), raramente gli animali esaminati morivano con segni di ematuria, ematemesi o rinorragia, segni evidenti di coagulopatia.
A conferma di quanto riportato, infatti, solo nel 42% dei casi si è assistito, in sede necroscopica a quadri riferibili a gravi disordini nella coagulazione (emorragie diffuse, versamenti emorragici), mentre si osservavano con più frequenza lesioni a carico dell'apparato gastro-enterico (da moderate a gravi), del pancreas (petecchie, emorragie), del timo (petecchie, soffusioni) e del fegato (fenomeni degenerativi).
Limitatamente al riscontro di positività a methomyl, le lesioni rilevate sono sovrapponibili a quelle riportate da altri autori (2), ossia prevalentemente caratterizzate da effetti tossici caratterizzati da scarsi reperti anatomo-patologici (lieve congestione degli organi e delle mucose). È importante però sottolineare che in un caso, le lesioni erano riconducibili all'effetto tossico del rodenticida utilizzato in associazione al methomyl.
Da quanto emerge nel presente lavoro, pertanto, non sussistono particolari differenze tra le lesioni provocate da differenti classi di veleni. Si osservano, infatti, in sede necroscopica, lesioni aspecifiche a carico di differenti distretti organici.
È necessario quindi sempre valutare l'anamnesi e l'esame necroscopico per avanzare il sospetto di avvelenamento. Inoltre, il valore predittivo positivo dell'esame tossicologico aumenta nel caso in cui venga esaminata, la carcassa dell'animale morto, anziché sulle presunte esche rinvenute sul territorio. Infatti, il dato di positività tossicologica risulta inferiore su quest'ultima tipologia di campione (35.4% vs 71%).
In accordo a quanto previsto dall'Ordinanza Ministeriale, il presente lavoro si colloca quindi tra i contributi sul ricorso alle indagini di laboratorio per la conferma di sospetto di avvelenamento.
In questo contesto, l'esame necroscopico diventa il primo atto per diagnosticare correttamente l'avvelenamento ed escludere pertanto altra *noxa* patogena.

BIBLIOGRAFIA

1. Dorman D.C., 1990. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Anticoagulant, cholecalciferol, and bromethalin-based rodenticides. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 20(2):339-52.
2. Luppi A., Perillo A., 1998. RILIEVI IMMUNOISTOPATOLOGICI IN DUE CANI INTOSSICATI DA METHOMYL. Annali della facoltà di Med. Vet. di Parma Vol. XVIII.
3. Miceli G., Ravalli P., Settimi L., Ballard T.J., Bascherini S. 2001. Intossicazioni acute da methomyl ed altri antiparassitari in provincia di Ragusa, Sicilia. Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 37, n. 2: 141-146
4. Murphy J.M., 2002. Rodenticides. Vet Clin Small Anim 32: 469-484.

ABSTRACT

Rodenticides are the toxicants most commonly encountered by pets and wildlife (birds and mammals). In recent years, a large number of animals have been sent to our laboratory because accidentally or, more often fraudulently, with the suspect being poisoned by pesticides, rodenticide or herbicide products. The aim of this study is to trace back the lesions occurred in animals linked to the most common baits are used. Principally we observed lesions to gastro-intestinal tract (66%), thymus and pancreas (21%). Only in few cases we still observed the baits in the stomach (26%).

INFLUENZA SUINA : DATI ITALIANI

Foni E.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Parma

Key words: Influenza suina, epidemiologia , studio genetico

SUMMARY
Results of epidemiological, antigenic and genetic studies on H1N1 H1N2 and H3N2 swine influenza viruses currently circulating in Italy are reported.

INTRODUZIONE

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia Orthomixoviridae, genere Influenzavirus che comprende tre tipi: A,B e C. I virus di maggiore importanza sia in ambito veterinario che umano sono i virus appartenenti al tipo A. Sono provvisti di un envelope e il genoma è caratterizzato dalla presenza di 8 filamenti di RNA a singola catena. Gli uccelli selvatici degli ambienti acquatici sono considerati la riserva naturale di questi virus che sono in grado di infettare varie specie di uccelli e mammiferi, uomo compreso. Gli stipiti vengono classificati a seconda delle caratteristiche dei determinanti antigenici di superficie, l'emoagglutinina (HA) e la neuroaminidasi (NA), antigeni coinvolti in modo determinante nei processi di infezione a livello delle cellule bersaglio e nella stimolazione del sistema immunitario, sia dopo infezione che vaccinazione. Attualmente si riconoscono 16 diverse HA e 9 diverse NA. La segnalazione della forma clinica indicata come influenza suina è concomitante alla epidemia umana di "Spagnola"(1918-1919) e il virus fu isolato e identificato da Shope nel 1930. Attualmente l'infezione è diffusa in tutte le aree del mondo in cui viene praticato l'allevamento intensivo del suino. In questo ospite l'infezione da virus influenzale si manifesta come una malattia respiratoria contagiosa che può avere un impatto economico rilevante nella gestione dell'allevamento intensivo. L'infezione si trasmette rapidamente nell'ambito dei vari settori dell'allevamento per contatto attraverso le secrezioni respiratorie ma anche per via aerea. La sintomatologia clinica è caratterizzata da tosse, starnuti, scolo nasale, febbre, letargia, dispnea e anoressia. L'evoluzione clinica è determinata dalle caratteristiche intrinseche del sottotipo virale, dalla situazione immunitaria di popolazione, ma anche dall'intervento di infezioni secondarie e dalle condizioni di allevamento.

Epidemiologia ed evoluzione genetica

Per le caratteristiche del genoma virale i virus influenza A, e quindi anche il virus dell'influenza suina, vanno incontro nel tempo a continue evoluzioni antigeniche determinate dall'accumulo di mutazioni a livello dei tratti genomici. Si tratta di mutazioni puntiformi, sostituzione, delezione e/o inserzione di basi che determinano differenze aminoacidiche a livello dei determonanti antigenici. Modifiche antigeniche si possono anche verificare per fenomeni di riassortimento cioè per scambio di tratti di genoma fra due o più virus influenzali che coinfettano lo stesso animale, anche provenienti da specie diverse. Questo processo porta alla definizione di una nuova variante. Il fenomeno viene identificato con il termine "shift antigenico" ed è specificamente utilizzato per indicare la comparsa di virus che mostrano "nuove" caratteristiche degli antigeni HA e NA e che possono comportare mutamenti drammatici sull' andamento epidemiologico-clinico della malattia. L'epidemiologia dell'influenza suina acquisisce risvolti di notevole importanza segnatamente a problematiche di sanità pubblica, non solo in quanto il virus si è dimostrato in grado di indurre infezione nell'uomo (7), ma anche perché la mucosa del sistema respiratorio del suino presenta recettori per il virus influenzale sia di origine umana che aviare. Pertanto potrebbe rappresentare la sede di origine di "nuovi virus" in seguito a modificazione di ceppi propri del suino, per adattamento di ceppo di origine aviare all'ospite mammifero o per riassortimento tra virus aviari ed umani (4-7). Il suino quindi rappresenta un ospite di importanza cruciale nella ecologia del virus influenzale nell'ottica di una possibile origine di virus con potenziale pandemico. L'evoluzione subita nel corso del tempo dal virus dell'influenza suina ha portato attualmente alla circolazione nella popolazione suina mondiale di tre diversi sottotipi H1N1, H3N2, H1N2. Contrariamente a quanto avviene per la specie umana, fino ad oggi, l'origine e la natura degli stipiti appartenenti ai tre sottotipi conservano un profilo legato all'area geografica di pertinenza. I virus H1N1, H3N2 e H1N2 europei sono geneticamente e antigenicamente distinguibili dagli stipiti circolanti nel Nord America e Asia. (1). I primi virus ad essere isolati dal suino in Europa e anche in Italia (8) appartenevano al sottotipo H1N1 ed erano strettamente correlati agli originari umani (A/Wisconsin/33 e A/ Puertorico/8/34) e al virus influenza suina denominato "classico" isolato da Shope negli Stati Uniti. A partire dal 1979 è stata segnalata la circolazione nella popolazione suina europea di uno stipite H1N1 "avian like" introdotto nella popolazione suina da anatre selvatiche (9). Questo virus ha circolato in Italia a partire dal 1985, contemporaneamente allo stipite classico per circa due anni, dopodiché lo ha rapidamente soppiantato (2). A partire dagli anni '70 in Europa, a seguito della pandemia umana da virus H3N2 Hong Kong, si è osservato anche nel suino la circolazione del sottotipo H3N2 geneticamente sovrapponibile al virus umano, non associato peraltro a forme cliniche particolarmente gravi. A metà degli anni '80, un evento riassortante ha portato alla comparsa, prima in Francia e Italia, poi nel resto di Europa, di un virus H3N2 con geni interni del virus suino "avian-like" H1N1 (3-5). Questo virus, che rappresenta anche oggi il sottotipo suino H3N2, ha manifestato una maggiore virulenza, facendo registrare episodi di gravità maggiore dal precedente stipite "human like". Attualmente la prevalenza dell' infezione da H3N2 è variabile nei vari paesi Europei. La circolazione è molto attiva in Italia, Belgio, Spagna e Germania, mentre il sottotipo H3N2 sembra essere scomparso in Gran Bretagna, Francia e Polonia. La circolazione del sottotipo H1N2 è stata per la prima volta registrata in Francia nella regione della Bretagna nel 1987, questo virus mostrava HA di origine aviare , NA di origine umana e i geni interni di origine aviaria. Risultava filogeneticamente riconducibile a riassortimento tra un virus influenzale suino "avian-like" e lo stipite "human-like" H3N2. Questo virus è stato rapidamente sostituito da virus H1N2 "di seconda generazione" con HA di origine umana che circola attivamente in Europa nord occidentale e in Italia. Negli stati del Nord America sono presenti gli stessi sottotipi H1N1, H2N3 e H1N2 ma con profili genetici completamente diversi. Fino al 1997 l'unico virus circolante era il virus H1N1 "classico" del suino, successivamente sono stati isolati virus H3N2 con geni suini,aviari ed umani che in seguito a riassortimento con il virus H1N1 "classico" hanno portato

alla circolazione di virus H1N1 e H1N2 con geni a triplo riassortimento.

Veniamo a considerare la situazione che oggi sta destando uno diffuso stato di allarme circa una possibile pandemia dalle conseguenze oggi difficilmente ipotizzabili. A seguito di episodi di influenza umana segnalati in Messico e poi in USA nell'aprile scorso, è stato isolato in California, un nuovo virus influenzale H1N1: " Pandemic H1N1 2009" (10). Non è stato dimostrato, ma è circolata l'ipotesi che l'uomo possa avere contratto l'infezione da suini di allevamenti messicani affetti da sintomatologia respiratoria. L'analisi filogenetica condotta sugli isolati ha permesso di accertare la presenza di 6 geni dei virus influenzali suini del Nord America e 2 geni del virus suino Eurasiatico. A breve distanza di tempo da questo primo isolamento il virus "Pandemic (H1N1) 2009" è stato isolato anche da suini in Canada.

Il Laboratorio della Sezione di Parma dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia ha operato da sempre nello studio dell'epidemiologia del virus influenzale suino. Attualmente possiede una collezione di oltre 400 ceppi di virus suino appartenenti ai tre sottotipi. Questo risultato è stato ottenuto grazie al monitoraggio dei focolai di malattia respiratoria condotto a partire dal 1979 ad oggi tramite applicazione di metodi diagnostici tradizionali (immunofluorescenza diretta, inoculazione delle uova embrionate), che nel corso degli anni sono stati affiancati da tecniche immunoenzimatiche (Elisa), biologiche (inoculazione substrati cellulari) e infine biomolecolari (PCR). Risultati particolarmente interessanti si sono ottenuti dallo studio di sensibilità di vari substrati cellulari. In particolare l'utilizzo comparativo a fianco delle uova embrionate (UE) di una linea cellulare di origine intestinale umana (CACO 2) ci ha permesso di aumentare il numero di isolati, ma soprattutto di verificare come la sensibilità del substrato utilizzato possa diversificarsi a seconda del sottotipo virale coinvolto nell'infezione. La linea cellulare CACO 2 ha permesso di ottenere un significativo aumento di isolamenti, per quanto riguarda i virus H1N1 e H1N2 rispetto al solo utilizzo delle UE. Infatti ben 86% dei ceppi di virus H1N2 si sono dimostrati in grado di replicare esclusivamente su CACO2. Per converso questo substrato ha permesso l'isolamento di virus H3N2 solo nel 50% dei casi. Dalla disamina dei dati si evince come anche in Italia a far tempo dagli anni 70 l'epidemiologia dell'influenza suina ricalchi l'andamento che si è osservato nel resto dei paesi Europei. Si osserva il prevalere di H1N1 fino ai primi anni '80, la comparsa dei primi ceppi di H3N2 negli anni seguenti e l'aumento della presenza di questo sottotipo nella popolazione suina negli anni 1998-2002, in cui puntualmente è comparso il sottotipo H1N2. Dal 2005 ad oggi la presenza dei tre sottotipi si è stabilizzata. Altro rilievo di interesse è che nel corso di 30 anni, pur variando alquanto sia le caratteristiche del sistema di allevamento suino che la situazione immunitaria della popolazione per l'introduzione della pratica vaccinale, l'incidenza della infezione da influenza nell'ambito delle forme respiratorie del suino, pur lievemente ondulante e con un picco del 38% nel 1998, sia rimasta in un range tra il 20% e il 30%. Anche lo studio dell'andamento della sieroprevalenza tramite ricerca di anticorpi specifici nei confronti dei tre sottotipi può fornire indicazioni in merito, ma considerata la variabilità genetica dei virus influenzale coinvolti negli episodi di malattia, il dato sierologico potrebbe non essere rispondente alla realtà virologica. Testando sieri convalescenti di suini con virus di riferimento, utilizzati nella routine sierologia, e con i ceppi omologhi isolati nel focolaio di malattia, si è potuto osservare che l'utilizzo di quest' ultimi ha permesso di rilevare, in modo statisticamente significativo, valori di positività più elevati.

L'introduzione nella attività del laboratorio di tecniche di analisi biomolecolari ha permesso di dimostrare attraverso l'analisi filogenetica dei ceppi via via isolati, la tendenza alla variabilità dei virus e anche di poter valutare quale tratto del genoma è coinvolta nella mutazione nonché l'entità della stessa. Nel complesso si può affermare che In Italia si rileva una lenta evoluzione dei sottotipi H1N1 e H3N2 che non si discostano significativamente dalle linee genetiche europee, mentre per il sottotipo H1N2 si osserva una maggiore variabilità. Nell'ambito di tutti i tre sottotipi è comunque stato possibile osservare la comparsa di stipiti riassortanti che finora non hanno mostrato caratteri di diffusibilità e sono pertanto da ricondurre a fenomeni sporadici. I dati acquisiti tramite lo studio filogenetico hanno permesso di valutare la "rassicurante" la lontananza genetica del virus H1N1 suino circolante in Italia dal virus "pandemic H1N1 2009". Questa osservazione va associata alla consapevolezza che questo virus, già introdotto nella popolazione italiana, può essere in grado di infettare altre specie animali, in particolare il suino che risulta la specie più a rischio per tutte le motivazioni già esposte. In questo contesto assume carattere strategico il rafforzamento della sorveglianza epidemiologica nei nostri allevamenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown IH (2000) The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. Vet Microbiol 74,29-46
2. CampitelliL, Donatelli I,Foni E,Catrucci MR, Fabiani C, Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. (1997) Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy: Virology 232,310-318.
3. CastrucciMR, Campitelli L, Ruggieri G, Barigazzi G, Sidoli L, Daniels R, Osford JS, Donatelli I (1994) Antigenic and sequenze analysis of H3 influenza virus haemoagglutinins from pigs in Italy. J Gen. Virol. 75, 371-379.
4. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum L G, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y (1998) Molecular basis for the generation in pig of influenza A viruses with pandemic, potential . J. Virol. 72, 7367-7373
5. MadecF, Gorreau JM, Kaiser C, Aymard M (1984): Apparition de manifestations grippales chez les porcs en association avec un virus A/H3N2. Bull. Acad. Vet. Fr. 57,513-522
6. Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennette M, Valette M, Aymard M, Foni E, Lin Y, Hay A (2002): Antigenic and genetic diversity among swine influenza A viruses in Europe. J. Gen. Virol. 83, 735-745.
7. Myers KP, Olsen CW, Gray GC (2007) : Cases of swine influenza in humans: a rewiew of the literature. Clin. Infect. Dis. 44,1084-1088.
8. NardelliL, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P (1978): Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. Zentralbl. Veterinarmed. B 25,853-857.
9. Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA (1981) : Evidence for the natural trasmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance in man. Bull. World Health Organ. 59, 75-78.
10. World Health Organization (WHO) "009a) Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR). Influenza A (H!N1). Avalaible at : http://www.who.int/csr/don/2009_06_19/en/index.htlm

ORIGINE ED EVOLUZIONE DELL'EPIDEMIA UMANA DA VIRUS DELL'INFLUENZA A (H1N1)V.

Giovanni Rezza

Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate
Istituto Superiore di Sanità

A metà marzo del 2009, in un periodo dell'anno in cui i casi di influenza tendono a diminuire, il Ministero della Sanità Messicano si rese conto di un numero crescente di casi di sindrome influenzale. Ma l'allarme vero e proprio scattò solo a metà aprile, quando casi atipici e *cluster* di gravi forme di polmonite iniziarono ad essere osservati in giovani adulti a Città del Messico e in altre aree del paese.

A fine marzo, nel sud della California, 2 bambini risultarono positivi per un virus dell'influenza A, di cui non si riuscì a identificare il sottotipo, finché i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) determinarono che si trattava di un nuovo virus dell'influenza A (H1N1) contenente materiale genetico di probabile origine suina. Questo virus non era stato precedentemente identificato né in suini né in esseri umani. Inoltre, i due bambini non avevano avuto contatti diretti fra di loro o con suini. Il 23 aprile un laboratorio di riferimento canadese identificò il nuovo virus influenzale in campioni di persone affette in Messico. Sabato 25 aprile l'OMS raccomandò agli stati membri di innalzare il livello di sorveglianza e controllo stabilite nei piani pandemici. Il 27 aprile, la conferma di focolai epidemici in altri due paesi oltre al Messico (Canada e Stati Uniti) spinse l'OMS a innalzare il livello di allerta dalla fase 3 alla fase 4, mentre il 29 aprile, a seguito della evidenza di trasmissione inter-umana sostenuta in almeno due paesi in una regione, si passò dalla fase 4 a 5. Pochi giorni dopo, a seguito del coinvolgimento dell'Australia, l'OMS dichiarò la fase 6, di massima allerta pandemica.

Da allora l'epidemia si è rapidamente diffusa non solo in Nord-America ma anche in America Latina, e poi in Gran Bretagna; da lì all'Europa continentale il passo è breve.

Questa prima fase dell'epidemia ci pone di fronte ad alcune domande principali: 1) quale è l'origine della malattia; 2) come si trasmette; 3) quanto è grave; 4) è possibile controllare o quantomeno contenere la diffusione dell'epidemia?

L'origine della nuova influenza umana A (H1N1)v non è chiara. Si tratta di un'infezione causata da un virus di apparente origine suina, derivato da un probabile rearrangement fra virus H1N1 suini di origine nord-americana (derivati a loro volta da un triplo riarrangiamento di componenti suine, aviarie ed umane) ed euro-asiatica. Sebbene non sia stato precedentemente identificato nei suini, analisi filogenetiche suggeriscono che tale variante è circolata in questa popolazione animale per alcuni anni, prima di passare all'uomo. Il presunto paziente 'zero' sarebbe un bambino messicano residente in un'area rurale. L'infezione sarebbe passata prima dall'animale all'uomo, e poi, adattandosi rapidamente al nuovo ospite, si sarebbe diffusa da persona a persona.

Le modalità di trasmissione di questo nuovo ceppo virale non differirebbero da quelle di una normale influenza stagionale, essendo trasmessa attraverso i *droplet*, emessi attraverso la tosse o gli starnuti, o anche attraverso il contatto delle mani con superfici contaminate. Trattandosi di un virus nuovo, trova la stragrande maggioranza della popolazione suscettibile. I valori stimati di R_0, ovvero del coefficiente riproduttivo di base di questa variante virale, si avvicinano a 1,5, ma è probabile che sottostimino il potenziale diffusivo del virus, presentandosi l'infezione con tassi elevati in particolare negli ambienti scolastici. Gli anziani, forse perché esposti in passato a virus simili, sarebbero in parte protetti dall'infezione.

Lo spettro clinico e, in particolare, la gravità della malattia, non è del tutto noto. Diversi casi fatali di polmonite sono stati rilevati in giovani adulti apparentemente sani, soprattutto in Messico. Ciò differenzierebbe il virus in causa dai comuni virus influenzali stagionali, che in genere provocano danni maggiori solo nei bambini più piccoli e nelle persone anziane e/o debilitate. Anche con H1N1v si sono però registrati casi gravi e decessi in persone con malattie croniche quali malattie respiratorie e/o cardiovascolari o tubercolosi, in donne gravide e in pazienti obesi. Sulla virulenza di questo ceppo virale bisogna però esser cauti, in quanto la maggior parte dei casi risulta essere di lieve o modesta entità. Il virus appare per ora sensibile a farmaci antivirali, quali gli inibitori della neuraminidasi, che potrebbero rappresentare di utile ausilio nei casi accertati. Anche su questo, però, bisognerà attendere verifiche cliniche più approfondite.

In attesa di un vaccino efficace e sicuro, che dovrebbe esser pronto per l'autunno, le misure di contenimento basate su una rapida identificazione dei casi e dei loro contatti, e il trattamento dei casi gravi, rappresentano gli unici strumenti per ritardare la diffusione dell'infezione e ridurne l'impatto clinico.

LA TULAREMIA: PATOLOGIA, ASPETTI ZOONOSICI E IMPLICAZIONI BIOTERRORISTICHE

MASSIMO FABBI
Sezione Diagnostica di Pavia, Istututo Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia Romagna, Centro di referenza Nazionale per la Tularemia

La Tularemia è una zoonosi insidiosa, talora non a tutti nota; è stata descritta per la prima volta nel 1911 da McCoy, nella contea di Tulare (California) nel corso di una epidemia simil-pestosa nello scoiattolo californiano (*Citellus beecheyi*). E' nota in diverse parti del mondo con diversi sinonimi: *"rabbit fever", "deerfly fever", "lemming fever"* negli Stati Uniti, *"yatobyo"* e *"malattia di Ohara"* in Giappone, *"water-rat trappers' disease"* in Russia.
L'agente responsabile, *Francisella tularensis,* è un piccolo coccobacillo gram negativo, intracellulare facoltativo, immobile, non sporigeno, provvisto di capsula e classificabile tra i cosiddetti microrganismi "*fastidious*". E' tra i più piccoli batteri conosciuti (0,2 x 0,2 - 0,7 µm) e probabilmente tra i più altamente infettanti sia per gli animali che per l'uomo. In natura è piuttosto resistente e persiste per diverse settimane nel fango, acqua e carcasse animali in decomposizione. E' in grado di sopravvivere e replicarsi all'interno di amebe a vita libera al pari di *Legionella*, una caratteristica utile alla sua sopravvivenza e replicazione in ecosistemi ambientali come acqua e fango. Del microrganismo sono noti diversi biotipi ma quelli di maggior interesse sono due:
F. tularensis subsp. *tularensis* (tipo A)**,** altamente virulento e talora fatale per l'uomo e diverse specie animali, presente in Nord America ma eccezionalmente segnalato anche in Europa (Slovacchia).
F. tularensis subsp. *holarctica* o *palaearctica* (tipo B), raramente fatale per l'uomo, altamente virulento per roditori e lagomorfi e presente in Usa, Asia ed Europa, Italia compresa. Altre *Franciselle* sono *F. tularensis* subsp. *mediasiatica,* diffusa nel continente asiatico e *F. tularensis* subsp. *novicida* di scarsa rilevanza sanitaria.

Epidemiologia
La Tularemia è presente nell'emisfero Nord del mondo. La si ritrova in Nord-America, Asia ed Europa (soprattutto centro orientale ma è presente anche in Francia, Spagna e Scandinavia). La prima segnalazione in assoluto della malattia risale al 1818 in Giappone ma esiste una segnalazione ancora precedente dalla Norvegia del 1653. In Italia è presente in forma sporadica o enzootica limitata nel tempo e nello spazio (Emilia-Romagna, Lombardia, Toscana, Liguria, Umbria). La prima segnalazione della malattia in Italia risale al 1931 anche se persistono alcune perplessità sulla sua effettiva conferma. La prima vera segnalazione della malattia risale tuttavia al 1964 a Pavia ad opera di Rinaldi e coll. che la segnalarono in una lepre trovata morta nell'Oltrepò pavese, mentre la prima sicura segnalazione della malattia nell'uomo è del 1966 ad opera di L. Bianchi. Egli descrisse alcuni casi di malattia con "cluster" familiari sempre nell' Oltrepò pavese collinare e tutti legati al contatto con lepri durante le operazioni di raccolta, eviscerazione e scuoiatura. Tre importanti epidemie nell'uomo si sono succedute a partire dagli anni ottanta: una in Toscana in provincia di Arezzo con circa 400 casi di malattia generati dalla ingestione di acqua contaminata proveniente da acquedotti non clorati e non protetti. Una seconda negli anni 90 in Liguria in Val di Vara con circa 70 casi verificatasi con le stesse modalità della precedente. L'ultima e la più recente si è registrata sempre in Toscana in provincia di Pistoia nel 2008 con oltre 40 casi, più di 200 persone esposte e legata al consumo di acqua di una sorgente di montagna.
La malattia nel mondo animale non è sempre facilmente rilevabile manifestandosi quasi esclusivamente in roditori e lagomorfi nell'ambiente selvatico. Qui infatti le predazioni spesso sono la regola e difficilmente gli animali sono portati alla osservazione e alla diagnosi di laboratorio. E' pur vero che casi di Tularemia in lepri vengono quasi ogni anno osservati sia in animali autoctoni sia in soggetti importati a scopo di ripopolamento (soprattutto provenienti da paesi dell'Est Europa ed in particolare dall' Ungheria). Quindi spesso la presenza della malattia emerge in maniera eclatante e preoccupante nel corso delle varie epidemie che man mano si succedono nell'uomo e non solo in Italia (es. Turchia, Scandinavia)

Negli animali
L'infezione è nota in almeno 145 specie di vertebrati e 111 di invertebrati. Tra i vertebrati sono maggiormente rappresentati i mammiferi e tra essi i lagomorfi (conigli e lepri), i roditori, gli insettivori, i mustelidi, i carnivori, gli ungulati e i marsupiali; a questi vanno aggiunte anche diverse specie delle altre classi dei vertebrati: uccelli, rettili, anfibi e pesci. Tra gli invertebrati vengono comprese diverse specie di zecche, tafani, zanzare e pulci. In natura, come più sopra accennato, la tularemia è tipicamente una malattia di roditori e lagomorfi nei quali si manifesta con quadri di setticemia letale a rapido decorso. Istruttiva a tale proposito una recente epidemia di tularemia occorsa negli USA in un gruppo di 1.200 cani della prateria (un roditore della famiglia degli sciuridi) catturati dall'ambiete selvatico e destinati all'esportazione come animali da compagnia (anche in Europa, Italia compresa) nel quale fu registrata una mortalità di circa 600 esemplari da *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tipo B). Il contagio tra le specie sensibili può avvenire in diversi modi: diretto tra animale malato e animale sano, con l'intervento di vettori passivi (zecche, zanzare) o l'assunzione di acqua e/o cibi contaminati.
Le zecche possono albergare il germe per mesi con trasmissione transovarica e transtadiale del germe.
La lepre, oltre ad essere tra le specie più sensibili all' infezione, è anche quella che, in caso di mortalità, viene più frequentemente conferita ai laboratori diagnostici per gli interessi economici che sottostanno al suo allevamento ed alla importazione e commercializzazione di soggetti provenienti da altri paesi. In questo contesto è utile rammentare che il rilievo in sede autoptica di un quadro di splenomegalia deve sempre far pensare alla possibilità possa trattarsi di tularemia in quanto lesione patognomonica dell'infezione. Altre malattie in grado di determinare splenomegalia nella lepre sono la Pseudotubercolosi, la Toxoplasmosi e la Pasteurellosi, che parimenti sono da tenere in debita considerazione nella diagnosi differenziale.
E' sempre utile raccomandare al personale interessato la cautela nel maneggiare carcasse di lepri morte o morenti associando l' utilizzo degli appositi Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) al fine di evitare di contrarre l'infezione in quanto *F. tularensis* è dotata di un'alta capacità infettante (da 1 a 10 batteri sono sufficienti a determinare malattia) ed è in grado di penetrare anche attraverso la cute integra oltre che attraverso le mucose.

Nell'uomo
L'uomo contrae la Tularemia con estrema facilità e può acquisire l'infezione attraverso diverse vie quali la via inalatoria, il contatto diretto o indiretto con diverse specie animali, l'ingestione di acqua o alimenti contaminati e la

puntura di insetti o artropodi vettori. Una via di infezione ripetutamente segnalata, soprattutto negli USA, associata allo sviluppo di forme polmonari è quella inalatoria connessa con il taglio dell'erba. Durante queste operazioni il materiale infettante (deiezioni infette, residui di carcasse animali, ecc.) viene sollevato dal vortice d'aria della macchina tosaerba e facilmente inalato dall'operatore.
In generale all'infezione possono conseguire differenti quadri clinici a seconda del punto di ingresso del microrganismo con evoluzione talora fatale (soprattutto la forma polmonare). Si distinguono pertanto (dati USA) una forma ulcero-ghiandolare (45-85% dei casi - letalità 5%), ghiandolare (10-25% dei casi), oculoghiandolare (< 5% dei casi), orofaringea (< 5% dei casi), polmonare (< 5% dei casi - letalità fino al 30%), tifoide (< 5% dei casi).
Gli eventi epidemici più rilevanti per l'uomo in Italia (Toscana e Liguria) sono risultati legati al consumo di acqua contaminata proveniente da acquedotti non protetti e non clorati e caratterizzati quasi esclusivamente da forme orofaringee con interessamento dei linfonodi latero-cervicali, sottomandibolari e tonsille. Gli episodi sporadici invece risultano connessi più frequentemente al contatto con lepri nelle fasi di manipolazione e cattura di soggetti ammalati o a seguito delle operazioni di scuoiamento antecedenti l'eviscerazione e la preparazione delle carni prima della cottura. A tale proposito è bene rammentare che il consumo delle carni cotte di per sé non rappresenta alcun rischio in quanto la cottura stessa inattiva rapidamente il germe.
Istruttiva della estrema infettività di *Francisella tularensis* è la segnalazione, avvenuta nel corso dell'epidemia Toscana degli anni '80, di una famiglia di 4 persone che accolse all'interno della propria auto una lepre in cattive condizioni di salute raccolta dal ciglio della strada. Tutti i componenti il nucleo familiare contrassero la malattia. In anni recenti (1999-2000) anche un importante epidemia di Tularemia nel Kosovo (450 casi accertati ma stimati più di 700) è stata determinata con tutta probabilità da una contaminazione della rete idrica e dall'ingestione di alimenti contaminati da roditori durante il conflitto bellico. In tali situazioni infatti i sistemi sanitari di controllo vengono quasi totalmente a mancare. Il contatto con acque infette è anche all'origine di un episodio di contagio umano per via percutanea segnalato nel 1998 in Spagna, nella provincia di Cuenca. In questo caso, numerosi pescatori e cuochi che avevano pescato e manipolato gamberi di fiume (*Procambarus clarkii*) contrassero la malattia.
Più rari sono gli episodi conseguenti al morso di zecche i quali tuttavia risultano particolarmente frequenti nei paesi dell'est Europa e negli USA.
Di rilievo appare la situazione in Scandinavia dove accanto alle forme classiche di trasmissione dell'infezione (contatto con lepri, acqua contaminata e morso di zecche) esiste una situazione del tutto diversa dalle altre legata ai numerosissimi casi di tularemia conseguenti a punture di zanzara. Questo aspetto apre nuovi quesiti epidemiologici sul ruolo delle zanzare e sulla loro competenza vettoriale. Si ipotizza che l'infezione delle larve sia sostenuta da un ciclo acquatico di *Francisella tularensis* legato sia ai roditori acquatici che alle amebe a vita libera in grado di albergare, mantenere e replicare il germe.
La diagnosi della malattia non è agevole soprattutto nelle prime fasi epidemiche o in presenza di casi singoli. La sintomatologia infatti è comune ad altre patologie sia nelle forme ulceroghiandolari che in quelle respiratorie. Tra le prime infatti sono da considerare anche le infezioni cutanee da Stafilococchi, l'Antrace, la Malattia da graffio del gatto, la Toxoplasmosi, i linfomi, l'HIV, l'Epstein-Barr, ecc. Tra le forme respiratorie la Legionellosi, la Psittacosi, la Febbre Q, l'infezione da Mycoplasmi, la Peste, la SARS, l'Influenza.
La terapia è antibiotica mediante l'utilizzo di Aminoglicosidi e in quest'ambito Streptomicina e Gentamicina, per le loro caratteristiche battericide, vengono preferite ad altre molecole. Lo stesso dicasi per i Chinoloni anche se recenti osservazioni indicano una loro maggiore tendenza a sviluppare resistenza a causa del loro diffuso impiego nelle infezioni urinarie.

***Francisella tularensis* come arma biologica**
A seguito dell'attacco terroristico al World Trade Center di New York e alla successiva disseminazione delle spore di Antrace sotto forma di polvere in buste postali i vari leader politici ed istituti di ricerca hanno dato un forte impulso alla ricerca stessa sugli agenti legati al bioterrorismo e tra questi *Francisella Tularensis.* Ciò ha portato a specifici accordi politici nell'ambito dei paesi del G8 e all'istituzione di gruppi specifici (Global Health Security Action Group) sulla verifica e confronto delle capacità diagnostiche per la Tularemia dei vari Paesi attraverso un "Tularemia Wetlab" tenutosi in Colorado presso il Center for Diesease Control and Prevention (CDC), Bacterial Zoonoses Branch. A tale iniziativa ha preso parte in rappresentanza dell'Italia anche il nostro Centro di Referenza Nazionale.
Gli elementi a favore dell'utilizzo di *F. tularensis* come arma biologica sono legati alla bassa carica infettante, alla facilità di disseminazione (per via aerea e attraverso l'acqua) e al potere patogeno del microrganismo.
Per le sue caratteristiche *F. tularensis* è stata considerata fin dal 1932 come arma biologica e quindi come possibile minaccia in tal senso sia dagli Stati Uniti d'America che dalla ex Unione Sovietica. Negli Stati Uniti il Center for Diesease Control and Prevention (CDC) classifica *Francisella tularensis* nella classe A degli agenti biologici con finalità bioterroristiche insieme a quelli del Vaiolo, Antrace, Peste, Botulismo e delle Febbri emorragiche (Ebola, Marburg, Lassa, Junin, ecc.) in quanto agenti che possono facilmente essere disseminati (acqua, aria), possono causare elevata mortalità, generare "panico e sconvolgimento sociale", principale fine perseguito dai terroristi.
E' stato anche ipotizzato che le epidemie di Tularemia occorse in decine di migliaia di soldati tedeschi e sovietici durante la seconda guerra mondiale fossero legate alla disseminazione intenzionale del germe.
Mediante tecniche di ingegneria genetica sono stati condotti tentativi per esprimere in *F. tularensis* resistenza al cloramfenicolo e tetracicline. Ceppi virulenti di *F. tularensis* streptomicino resistenti sono stati esaminati e selezionati nel corso di studi finalizzati al bioterrorismo sia dagli Stati Uniti che dall'Unione Sovietica.
L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha effettuato una simulazione ipotizzando l' impiego di *Francisella tularensis* come arma biologica. Un aerosol di 50 Kg di *Francisella tularensis* dispersa su un' area metropolitana di 5 milioni di persone sarebbe in grado di generare 250.000 persone ammalate, 19.000 morti, sintomi persistenti per settimane e mesi in aggiunta ad un costo sociale di 5,4 Bilioni di dollari ogni 100.000 persone esposte. Un vaccino vivo attenuato derivato da un ceppo avirulento di *F. tularensis* è stato impiegato a scopo sperimentale negli Stati Uniti ed è tutt'oggi allo studio e finalizzato alla protezine dei militari e laboratoristi. La finalità è quella stimolare l'immunità cellulare (cellule T) che è in grado di conferire una immunità particolarmente duratura (fino a 25 anni), cosa che si verifica anche durante l'infezione naturale. L'immunità umorale invece non è in grado di proteggere dall'infezione con ceppi virulenti di *Francisella tularensis.* L'impiego del vaccino è attualmente in corso di revisione negli Stati Uniti da parte della Food and Drug Administration (FDA) e la sua futura disponibilità è attualmente incerta.

ENCEFALITE DA ZECCHE IN UN CANE

Zanoni M.[1], Ortolani D.B.[2], Bonilauri P.[1], Gelmetti D.[1], Fabbi M.[1], Cordioli P.[1] e Alborali L.G.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy;

[2]Medico veterinario Libero Professionista, Salò (Bs), Italy

key words: artropodi, tick borne encephalitis, cane

ABSTRACT
Tick-borne encephalitis (TBE) is caused by a Flavivirus and transmitted by ticks, distribution of TBE-infection in dogs expands over the European continent.
The study concerns a lethal case in a dog that was staying in endemic area (Hungary) for a short period in April 2009.

INTRODUZIONE
Il virus dell'encefalite da zecche (TBE) appartiene alla famiglia dei Flaviviridae ed è trasmesso dalla puntura degli artropodi; è un virus ad RNA con envelope che viene mantenuto in natura da un ciclo biologico silvestre e da un ospite serbatoio vertebrato (2). Questa patologia è nota in Europa fin dall'inizio del secolo e costituisce un rilevante problema di Sanità pubblica nell'Europa centro orientale. L'aumento della frequenza di queste patologie in Europa (1-9) è da imputare sia ai cambiamenti climatici in atto, sia all'aumento degli spostamenti, soprattutto per turismo, degli uomini e dei relativi animali da compagnia.
Viene descritto un episodio di encefalite da zecche in un cane che al ritorno dall'Ungheria è deceduto dopo aver manifestato sintomatologia neurologica di tipo paraplegico.

DESCRIZIONE DEL CASO CLINICO
L'anamnesi riferisce di un cane, maschio, meticcio di grossa taglia di 12 anni di età, regolarmente vaccinato anche nei confronti del virus della rabbia, recatosi con i proprietari a Budapest (Ungheria) per un soggiorno turistico primaverile (aprile 2009). Dopo sei giorni di permanenza all'estero sono state rinvenute due zecche "grigie" di medie dimensioni, che sono state prontamente asportate ed eliminate dai proprietari. Proseguendo il viaggio attraverso la Slovenia, l'Austria e la Germania, con sosta a Colonia, dopo tre giorni sono state trovate altre due zecche a detta del proprietario identiche alle prime. Il cane rientrato in Italia (in decima giornata), immediatamente dopo l'arrivo interrompe l'alimentazione e si rifiuta di camminare.
Alla prima visita clinica è stata riscontrata polipnea e difficoltà di deambulazione; il giorno successivo per il peggioramento delle condizioni, e stato sottoposto ad una seconda visita clinica dove sono stati osservati i seguenti sintomi amaurosi, irrequietezza lamenti continui, e dolorabilità diffusa.
Il soggetto aggravatosi progressivamente, è stato portato d'urgenza al pronto soccorso dove, dopo aver morsicato il proprietario, avviene il decesso. A seguito della morsicatura del proprietario la carcassa à stata inviata al Laboratorio Rabbia dell'IZSLER di Brescia per gli accertamenti diagnostici del caso.

MATERIALI E METODI
Il materiale patologico prelevato al soggetto è stato sottoposto alle seguenti indagini di laboratorio:

- *Immunofluorescenza diretta (FAT)* per ricerca del virus della Rabbia (metodica OIE Terrestrial manual 2008). Per la diagnosi diretta di rabbia si procede all'allestimento di uno striscio di materiale cerebrale prelevando l'ippocampo, il tronco encefalico e il cervelletto lo striscio, fissato in acetone, viene immuocolorato con uno specifico anticorpo policlonale coniugato.
- *Prova biologica su topino* (metodica OIE Terrestrial manual 2008). L'omogenato del tessuto cerebrale, opportunamente chiarificato, è stato inoculato, per via intracerebrale, in topini (SPF) di razza Swiss di 10-12 giorni di vita; l'inoculazione è stata eseguita previa sedazione con cloroformio dei soggetti. Gli animali sono stati sottoposti a monitoraggio clinico giornaliero.
- *Esame istopatologico*: la corteccia cerebrale, parte del talamo e del cervelletto nonché gli organi dei topi (cuore, fegato, polmone ed encefalo) sono stati fissati in formalina 10%, inclusi in paraffina e colorati con ematossilina-eosina.
- *Esame virologico*: il materiale patologico prelevato dal cane e quello di topo, sono sati inoculati su cellule primarie di rene suino e linee continue di rene di cane (MDCK) e di scimmia (VERO e MARC 145).
- *Identificazione agente eziologico*. Due PCR una in grado di rilevare la presenza di RNA di flavivirus (7) e una Real Time PCR specifica per il virus della TBE (8) sono state applicate partendo dal materiale biologico ottenuto a seguito della prova biologica su topino.

RISULTATI
L'osservazione al microscopico a fluorescenza del preparato in *FAT*, non ha evidenziato la presenza di specifici aggregati riferibili a *Rhabdovirus*.
Prova Biologica: dopo sette giorni dall'infezione uno dei topini decede spontaneamente mentre gli altri soggetti presentano apatia e pelo arruffato. Il giorno successivo anche gli altri topini vanno incontro a morte.
Il tessuto cerebrale dei topini deceduti è stato analizzato per la seconda volta con FAT sempre per l'esclusione del *Rhabdovirus*.
Esame istopatologico: si osserva meningoencefalite linfoistiocitaria. Nella sostanza grigia evidenti necrosi neuronali, gliosi diffusa e manicotti perivasali costituiti da linfociti, plasmacellule, istiociti e più raramente, granulociti neutrofili. Nella sostanza bianca, emorragie e focali aree malaciche. Nelle sezioni di encefalo dei topi era altresì osservabile una meningoencefalite linfoistiocitaria di minor intensità. In cuore, fegato e polmone non reperti di rilievo.
PCR: dal materiale proveniente dal topo, entrambe le PCR sono risultate positive, testimoniando la presenza di RNA di flavivirus successivamente identificato come TBE.
Esame virologico: dal materiale patologico di topo su linea cellulare VERO, già dal secondo passaggio, si è evidenziato un effetto citopatico. La conferma dell'isolamento del virus della TBE è avvenuta tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici rilevati in immunofluorescenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
Le encefaliti virali della specie canina sono patologie rilevanti ed estremamente attuali; dal punto di vista clinico difficilmente diagnosticabili in quanto la sintomatologia è sovrapponibile a quella di tutte le altre forme di encefalite a diversa eziologia. La diagnosi eziologica necessita di un approfondito iter di laboratorio considerando fra le

diagnosi differenziali tutte le altre patologie interessanti il sistema nervoso centrale. Le encefaliti virali maggiormente rappresentate nella specie canina sono sintetizzabili nella Malattia di Aujeszky, nel Cimurro, nelle encefaliti sostenute dai virus appartenenti alla famiglia dei Bunyaviridae, dei Reoviridae e Rhabdoviridae; quest'ultima è la forma nervosa più conosciuta anche per le notevoli ripercussioni che riveste nell'ambito della sanità pubblica.
Nella famiglia dei Flaviviridae sono annoverati diversi virus (encefalite di St. Louis, encefalite giapponese, Louping-ill, Powassan e TBE), responsabili di encefaliti in varie specie animali, sia in Europa sia in altri continenti (1-2). Il virus dell'encefalite da zecca negli animali domestici determina patologie subcliniche, cliniche croniche e i soggetti colpiti mostrano i segni neurologici di un'encefalite (6). Nell'uomo è responsabile di meningiti e meningoencefaliti (3-4).
Viene trasmesso dal morso delle zecche e tutti gli stadi di sviluppo (larva, ninfa e adulto) possono risultare potenzialmente infettivi, anche se solo l'1% delle zecche restano infette per tutta la vita.
Nel caso descritto i sintomi clinici, il rinvenimento di zecche e il recente viaggio all'estero, hanno fin da subito fatto supporre una patologia a carico del SNC di probabile origine virale, ma le indagini di laboratorio svolte e il repentino decesso dell'animale non hanno permesso di formulare una diagnosi in vita.
Essendo il cane un soggetto "morsicatore" il suo invio al L. Rabbia dell'IZSLER, ha permesso di effettuare una serie di accertamenti che hanno dimostrato la presenza dell'antigene virale della TBE.
In conclusione possiamo affermare che considerando le potenzialità zoonosiche di questo virus, supportate anche dall'attiva replicazione dell'antigene, e della difficoltà della diagnosi clinica è importante puntare sulla prevenzione come mezzo di controllo della malattia.
L'utilizzo negli animali di antiparassitari e di repellenti e la valutazione della reale stima dell'incidenza delle encefaliti nel cane, in particolare della TBE, rappresentano i principali aspetti di una sorveglianza attiva e di una efficace profilassi sanitaria.

BIBLIOGRAFIA

(1) Beugnet F., Marlè JL.(2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. Vet. Parasitol. 2009: epub ahead of print.
(2) Greene C. E. (2003). Arboviral infections, artropode-borne encephalomyelitis. In: Malattie infettive del cane e del gatto. (C. E. Greene,2°ed), W. B. Sauders, Philadelphia, 131-132.
(3) Kaiser R., Vollmer H., Schmidtke K., Rauer S., Berger W. (1997) Verlauf und prognose der FSME. Nervenarzt (1997) 68,324-330.
(4) Kunz C.(1994).Frühsommer-meningoenzephalitis in Europa. In: Durch Zecken übertragbare Erkrankungen. Weller Verlag, Schriesheim 1994, 23-30.
(5) O.I.E. Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals, – edition, 2008, cap 2.1.13, par. B.1.c.ii) "Rabies".
(6) Süss J, Schrader C., Abel U., Voigt W. P., Schosser R.(1998). Annual and seasonal variation of tick-borne encephalitis virus prevalence in ticks in selected hot spot areas in Germany using a nRT-PCR: result from 1997 and 1998. Zent.bl. Bakteriol. 1999, 289: 564-578.
(7) Scaramozzino N, Crance J, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin G (2000). Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequenze. Journal of Clinical Microbiology 39 (5): 1922-1927.
(8) Schwaiger M., Cassinotti P. (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. Journal of Clinical Virology 27 (2003) 136/145.
(9) Süss J. (2007). Tick borne encephalitis in Europe and beyond- The epidemiological situation as of 2007. Euro Sorveill. 2008:13.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i tecnici di laboratorio Andrea Moneta, Giuseppe Orlandi e Massimo Datteri per la collaborazione fornita.

PREVALENZA DI PATOGENI IN ZECCHE PRESENTI IN SICILIA

Torina A.[1], Alongi A.[1], Scimeca S.[1], La Barbera G., Vicente J.[2], de la Fuente J.[2,3] , Caracappa S.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Italia.
[2]Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Spain.
[3]Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, USA.

Keywords: Ixodidae, epidemiologia, free-living

ABSTRACT. The prevalence of Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia and Babesia/Theileria species was analyzed in questing and feeding adult ticks in Sicily. A total of 678 ticks were collected and analyzed in this study. These preliminary results suggested that the most important vectors of pathogens that may affect human and/or animal health in Sicily are Rh. turanicus for Anaplasma spp. and D. marginatus for Rickettsia spp. For Ehrlichia spp. and Babesia/Theileria spp., Rh. turanicus/D. marginatus and Hy. lusitanicum may be the most important vectors.

INTRODUZIONE

Le zecche (Acari: Ixodidae) sono vettori di patogeni responsabili di patologie dell'uomo e degli animali in tutto il mondo (5). Lo sviluppo e l'incremento di misure di controllo per questi microrganismi trasmessi da zecche, dipende dalla conoscenza dell'epidemiologia dei vettori in una particolare area geografica. La Sicilia rappresenta un tipico ecosistema Mediterraneo che permette di studiare l'infestazione da zecche e la prevalenza di patogeni trasmessi da esse (9). Diversi studi hanno caratterizzato la prevalenza delle malattie trasmesse da zecche negli ospiti vertebrati della Sicilia (2, 3, 4, 8, 10).
In questo studio, abbiamo condotto una caratterizzazione preliminare della prevalenza di specie di Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia e Babesia/Theileria nelle zecche adulte siciliane sia free-living che raccolte su ospiti vertebrati. I risultati di questi studi sono significativi per approfondire l'epidemiologia delle malattie trasmesse da zecche nel nostro territorio e in altri ecosistemi del Mediterraneo.

MATERIALI E METODI

Sono state raccolte ed analizzate 678 zecche raccolte in 27 aziende di diverse aree siciliane (Palermo, Enna, Messina, Siracusa e Trapani). I vettori sono state identificati utilizzando le chiavi morfologiche per le Ixodidae italiane (6), sono state incubate per tre giorni in laboratorio prima di effettuarne l'eviscerazione e l'estrazione del DNA per consentire la clearance di microrganismi non infettivi dalle zecche.
Il DNA delle zecche è stato estratto utilizzando il TriReagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguendo la procedura indicata nel foglietto illustrativo della ditta produttrice. Il DNA è stato risospeso in acqua distillata sterile e conservato a -20ºC fino al momento dell'uso. Le PCRs per Anaplasma, Ehrlichia e Rickettsia spp. sono state condotte come già precedentemente descritto (Torina et al., 2007) con µl (0.1-10 ng) di DNA, 10 pmol di ciascun primer e le beads Ready-To-Go PCR (Amersham, Piscataway, NJ, USA). Le reazioni di PCRs sono state standardizzate in un termociclatore automatico per DNA in 35 cicli. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% per evidenziare la dimensione dei frammenti amplificati in seguito al confronto con un marcatore di pesi molecolari (1 Kb DNA Ladder, Promega). Nelle reazioni sono stati utilizzati dei controlli senza aggiunta di DNA in modo da individuare eventuali contaminazioni durante le PCRs. Per il rilevamento di Babesia/Theileria spp. è stata utilizzata la Reverse Line Blot (RLB) secondo la metodica già descritta preventivamente (7).
Per individuare le differenze statistiche fra la prevalenza delle infezione da patogeni nelle differenti specie di zecche, è stato utilizzato il Fisher test che analizza i dati (appaiati e non variabili) ottenuti dalle zecche free-living.

RISULTATI E DISCUSSIONE

È stata analizzata la prevalenza delle specie di Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia e Babesia/Theileria nelle zecche adulte siciliane, sia free- living che su ospiti vertebrati. Delle 678 zecche raccolte e analizzate in questo studio, 29 erano zecche free-living mentre 649 sono state raccolte da bovini, ovini, caprini e cani naturalemente infestati. Gli Ixodidae raccolti appartenevano alle specie Rhipicephalus bursa, Rh. turanicus, Rh. sanguineus, Hyalomma lusitanicum, Hy. marginatum, Dermacentor marginatus, Ixodes ricinus, Rh. (Boophilus) annulatus e Haemaphysalis punctata. Fatta eccezione per Rh.annulatus e Haem. punctata analizzate soltanto nelle quantità di 8 e 15 rispettivamente e risultate negative nella ricerca dei patogeni, tutte le diverse specie di parassiti erano infette (Tabella 1 e 2).
Come in precedenti studi condotti in Sicilia e in altre aree del Mediterraneo (2, 5, 9, 10), l'Anaplasma spp. è stata trovata in Rh. bursa e Rh. turanicus prelevate da ospiti ovini e caprini, Rh. sanguineus prelevate da cani e Hy. lusitanicum, Hy. marginatum e Ix. ricinus prelevate da bovini. Rickettsia spp. è stata trovata in Rh. turanicus prelevate da ovini e Hy. marginatum e D. marginatus prelevate da bovini. Ehrlichia spp. è stata trovata in Hy.lusitanicum, Hy. marginatum, D. marginatus e Ix.ricinus prelevate da bovini. Rh. bursa prelevate da ovini e Hy. marginatum prelevate da bovini erano infettate con Babesia/Theileria spp. Ovini, caprini, bovini e cani sono stati già descritti quali ospiti per i patogeni trasmessi da zecche in Sicilia (2, 8, 9, 10).
È' stato precedentemente dimostrato che gli Ixodidae eliminano i microrganismi attraverso un periodo di 4 giorni a partire dalla loro rimozione da un ospite con elevata parassitemia (1).
La maggior parte delle zecche erano infettate con un singolo patogeno. Comunque, una Ix. ricinus raccolta da bovino e una Rh. turanicus free-living erano infettate con Anaplasma ed Ehrlichia spp. Anaplasma, Ehrlichia e Rickettsia spp. e Rickettsia e Babesia/Theileria spp. sono state ritrovate in due differenti zecche, Hy. marginatum raccolte da bovino.
I dati provenienti dalle zecche free-living sono stati utilizzati per una preliminare caratterizzazione della prevalenza dei patogeni trasmessi da zecche. Per testare le differenze tra le specie di zecche free-living nella prevalenza delle infezioni per differenti patogeni, è stato utilizzato il Fisher test che confronta dati appaiati e non variabili (Tabella 2). Sono state trovate differenze significative per Anaplasma spp. in Rh. turanicus che esprime la più alta prevalenza rispetto a R. sanguineus (P=0.01) e D. marginatus (P=0.02). Per Ricketsia spp., D. marginatus mostrava statisticamente la più alta prevalenza rispetto a H. lusitanicum (p=0.025). Non sono state trovate differenze significative. Questi risultati suggeriscono che i principali vettori di patogeni che rappresentano un rischio in Sicilia sono Rh. turanicus per Anaplasma spp. e D. marginatus e Rh.sanguineus per Rickettsia spp . Per Ehrlichia spp. e Babesia/Theileria spp., Rh. turanicus, D. marginatus e Hy. lusita-

nicum potrebbero essere i più importanti vettori, ma necessitano ulteriori studi per confermare questi risultati. Rh. turanicus è tra le specie più presenti in Sicilia ed il suo habitat più idoneo è correlato con la prevalenza di Anaplasma spp. (9). Oltretutto, Rh. turanicus che si nutre su bovini, ovini e caprini è stata trovata infettata con Anaplasma spp. in Sicilia (10). D. marginatus si nutre su ospiti mammiferi quali bovini, equini, ovini e suini (Kolonin, 2009) infettati con Rickettsia, Ehrlichia e/o Babesia/ Theileria spp. in Sicilia (8).
I risultati ottenuti dimostrano la prevalenza di Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia e Babesia/Theileria nelle zecche adulte siciliane, sia le free-living che quelle provenienti da ospiti mammiferi. La caratterizzazione preliminare di patogeni trasmessi dalle zecche free-living, individua delle differenze nelle diverse specie di Ixodidae sia per quanto riguarda il ruolo assunto nel ciclo vitale che nella trasmissione dei patogeni. Questi studi dovrebbero essere estesi e includere campioni in grado di dare una copertura dell'intera isola. In conclusione si auspica che queste informazioni siano importanti per gli studi epidemiologici di patogeni trasmessi da zecche nel nostro territorio oltre che per valutare i rischi associati con la trasmissione di patogeni a uomini e animali.

RINGRAZIAMENTi
Questo studio è stato sostenuto dal progetto IZS SI 10-06 del Ministero della Salute in Italia. Un supporto parziale è stato anche fornito dal Ministero della Scienza e Innovazione (progetto BFU2008-01244/BMC), dal progetto intramurale CSIC 200830I249 JF, Ministero dell'Educazoione e della Scienza (MEC; project AGL2005-07401) e dal FEDER della Spagna.
Si ringrazia Franco Ferraro per la collaborazione.

BIBLIOGRAFIA
de la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., McEwen, B.R., Clawson, D., Kocan, K.M., (2001) Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of the ehrlichial pathogen Anaplasma marginale. Int. J. Parasitol. 31, 1705-1714.
de la Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furlá, R., Almazán, C., Kocan, K. M., (2005a) Serologic and molecular characterization of Anaplasma species infection in farm animals and ticks from Sicily. Vet. Parasitol. 133, 357-362.
de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S., Vicente, J., Mangold, A.J., Vicari, D., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K.M., (2005b) Genetic diversity of Anaplasma marginale strains from cattle farms with different husbandry systems in the Province of Palermo, Sicily. J. Vet. Med. B 52, 226-229.
de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., Kocan, K.M., (2006) Molecular characterization of Anaplasma platys strains from dogs in Sicily, Italy. BMC Vet. Res. 2, 24.
de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. Front. Biosc. 13, 6938-6946.
Manilla, G. (1998) Fauna d'Italia-Acari-Ixodida. Edizioni Calderoni Bologna.
Schnittger, L., Yin, H., Qi, B., Gubbels, M.J., Beyer, D., Niemann, S., Jongejan, F., Ahmed, J.S., (2004) Simultaneous detection and differentiation of Theileria and Babesia parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. Parasitol. Res. 92, 189-196.
Torina, A., Vicente, J., Alongi, A., Scimeca, S., Turlá, R., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S., de la Fuente, J., (2007) Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005. Zoonoses Public Health 54, 8-15.
Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Peña, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A.M.F., Salina, F., Caracappa, S., de la Fuente, J., (2008) Prevalence and genotypes of Anaplasma species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. Appl. Env. Microbiol. 74, 7578-7584.
Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Scimeca, S., Nicosia, S., Di Marco, V., Caracappa, S., Kocan, K.M., de la Fuente, J., (2008b) Characterization of Anaplasma infections in Sicily, Italy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 90-93.

tabella 1 –Prevalenza di patogeni nelle zecche adulte in Sicilia dopo il pasto di sangue su ospiti mammiferi

Specie di Patogeni	Specie di zecche (%)						
	Rh. bursa	*Rh. turanicus*	*Rh. sanguineus*	*Hy. lusitanicum*	*Hy. marginatum*	*D. marginatus*	*Ix. ricinus*
Anaplasma	4/80 (5)	4/52 (8)	5/156 (3)	2/153 (1)	1/67 (1)	0/32 (0)	2/86 (2)
Rickettsia	0/80 (0)	3/52 (6)	3/156 (2)	0/153 (0)	3/67 (4)	5/32 (16)	0/86 (0)
Ehrlichia	0/80 (0)	1/52 (2)	0/156 (0)	4/153 (3)	2/67 (3)	3/32 (9)	5/86 (6)
Babesia / Theileria	11/80 (14)	0/52 (0)	0/156 (0)	5/153 (3)	11/67 (16)	0/32 (0)	0/86 (0)

Sono incluse in Tabella solo le specie di zecche risultate infettate.

Tabella 2 – Prevalenza di patogeni nelle zecche free-living in Sicilia.

Specie di Patogeni	Specie di zecche (%)				
	Rh. turanicus	*Rh. sanguineus*	*Hy. lusitanicum*	*D. marginatus*	*Ix. ricinus*
Anaplasma	2/2 (100)a	0/10 (0)b	1/8 (12)	0/8 (0)b	1/1 (100)
• *Rickettsia*	• 0/2 (0)	• 3/10 (30)	• 0/8 (0)b	• 5/8 (62)a	• 0/1 (0)
• *Ehrlichia*	• 1/2 (50)	• 0/10 (0)	• 0/8 (0)	• 3/8 (37)	• 0/1 (0)
• *Babesia/ Theileria*	• 0/2 (0)	• 0/10 (0)	• 5/8 (62)	• 0/8 (0)	• 0/1 (0)

Per individuare le differenze tra le specie di zecche nella prevalenza delle infezioni è stato utilizzato il Fisher test che analizza i dati. Le lettere rappresentano differenze significative ($P<0.05$).

INDAGINI SULLA PRESENZA DI TOGGENBURG VIRUS (TOV) IN ITALIA

[1]Sozzi E., [1]Boniotti B., [2]Thuer B., [2]Hofmann M., [1]Moreno A., [1]Lelli D., [1]Fontana R., [1]Martinelli N., [1]Lombardi G., [1]Cordioli P., [1]Lavazza A.

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia, Italy;
[2]Institute of Virology and Immunoprophylaxis, Mittelhaeusern, Switzerland

Key words: Toggenburg virus, capra, infezione sperimentale

SUMMARY

The novel bluetongue-like orbivirus, named Toggenburg virus (TOV), was detected in a healthy goat in Italy by serological and virological methods. Experimental infections of goats, sheep and calf, using TOV-positive blood samples, were performed. Animals did not show any clinical or pathological signs but antibodies and viral RNA were detected in blood samples of experimentally infected goats and sheep. Further investigations on the prevalence of this virus in Italy are needed to improve the knowledge on its epidemiology.

INTRODUZIONE

La bluetongue (BT) è una malattia infettiva non contagiosa ad eziologia virale dei ruminanti, trasmessa da insetti appartenenti al genere *Culicoides* [4].

Il virus della bluetongue (BTV) appartiene alla famiglia *Reoviridae*, genere *Orbivirus*, che comprende anche altre specie, tra cui African Horse Sickness virus (AHSV), Epizootic Haemorrhagic Disease virus (EHDV) e altri virus meno conosciuti come Peruvian Horse Sickness virus, Chuzan virus, Saint Croix River virus e Yunnan orbivirus [3]. BTV è un virus a RNA bicatenario, il cui genoma è composto da 10 segmenti genici che codificano per sette proteine strutturali (da VP1 a VP7) e per quattro proteine non strutturali (NS1, NS2, NS3 e NS3a). Attualmente sono identificati 24 sierotipi, molti dei quali correlati tra loro e distinguibili in base al profilo antigenico della proteina capsidica esterna VP2.

BTV è comparso nel bacino del Mediterraneo per la prima volta nel 1998. Da allora si è assistito ad una progressiva espansione dell'infezione verso Nord; in Italia, nel corso di queste epidemie, sono stati isolati i sierotipi virali 1, 2, 4, 6, 8, 9 e 16.

Nell'ambito del sistema di sorveglianza implementato in Svizzera, in seguito ai focolai di BTV sierotipo 8, è stato identificato in capre clinicamente sane un nuovo orbivirus BTV-like, denominato Toggenburg orbivirus (TOV). In base all'analisi filogenetica Toggenburg orbivirus è risultato strettamente correlato a BTV, ma con omologie solo del 63% (segmento 2) con i ceppi di referenza dei 24 sierotipi di BTV. Per questo è stato suggerito che TOV potrebbe rappresentare il venticinquesimo sierotipo di BTV [2].

Questo lavoro descrive il riscontro e l'identificazione in Italia di una positività sierologica e virologica per Toggenburg orbivirus in un allevamento caprino della provincia di Como e descrive i risultati preliminari di infezioni sperimentali condotte in diverse specie animali.

MATERIALI E METODI

Campioni di campo

Nell'ambito del Piano di Monitoraggio istituito dalla Regione Lombardia nel periodo ottobre – febbraio 2008, di concerto con il Ministero della Salute, a seguito del riscontro ed identificazione in Svizzera ed in Canton Ticino di positività sierologiche e virologiche per TOV, sono state testate 49 aziende di capre, per un totale di 488 campioni. I campioni di sangue sono stati prelevati in provetta con anticoagulante EDTA, in concomitanza col piano di controllo della brucellosi caprina.

Sierologia

Per la ricerca di anticorpi verso BTV sono state impiegate tre metodiche immunoenzimatiche tipo ELISA: Blue Tongue Antibody Test (IZSAM), ID Screen Blue Tongue Direct e ID Screen Blue Tongue Competition (ID.VET, Montpellier, France). Questi metodi ELISA sono tutti specifici per la ricerca di anticorpi rivolti verso VP7. La ricerca è stata condotta nel plasma per gli animali prelevati in campo e nel siero per gli animali sottoposti ad infezione sperimentale.

Infezioni sperimentali

Nel corso della prima prova sono state infettate due capre di 18 mesi d'età per via endovenosa con 2 ml di sangue lavato e lisato del campione di campo risultato TOV-positivo.

Nel corso della seconda prova sono state inoculati per via endovenosa una capra di 22 mesi di età, due agnelli di 4 mesi ed un vitello di 6 mesi di età con rispettivamente 2ml, 2ml/pecora e 4ml di un pool di sangue lavato e lisato ottenuto dalla prima infezione sperimentale.

Entrambe le infezioni sperimentali sono state condotte in laboratorio di biosicurezza livello 3 e gli animali ubicati in ambienti separati secondo la specie. Prima dell'infezione gli animali sono stati testati sia per ricerca anticorpi verso BTV tramite ELISA competitiva (IZSAM) sia per ricerca RNA virale tramite RT-PCR real time e verificata la negatività.

Tutti gli animali sono stati prelevati a cadenza settimanale in provetta con e senza EDTA e monitorati quotidianamente per verificare la comparsa di sintomi clinici. La capra inoculata nella seconda infezione sperimentale è stata sottoposta ad eutanasia in modo incruento previa sedazione farmacologica 19 giorni post-infezione (P.I.).

Isolamento virale

Il sangue prelevato in provette con anticoagulante è stato lavato tre volte ed i globuli rossi risospesi in *phosphate buffered saline* (PBS).

In sede necroscopica dalla capra soppressa a fine prova sono stati prelevati milza, midollo osseo e linfonodi (polmonari, sottomandibolari, mesenterici, inguinali e toracici). Quindi sono stati preparati omogenati di tessuto al 10% (w/v) in terreno Minimum Essential Medium Eagles (MEM) contenente antibiotici.

I globuli rossi lavati e gli omogenati di tessuto sono stati inoculati in:

- Coltura primaria di rene embrionale bovino, cellule Vero e linea cellulare di insetto C6/36 (Aedes albopictus), come descritto da Chaignat et al. (2009) [1].
- Uova embrionate di pollo (UEP) SPF di 10-12 giorni per via intravenosa, secondo le indicazioni riportate dall'OIE [5].
- Topi neonati, per via intracerebrale.

Identificazione virale

L'evidenziazione dell'acido nucleico è stata effettuata mediante RT-PCR real time e caratterizzazione genetica.

L'RNA virale è stato estratto a partire da 0,5 ml di sangue intero in presenza di EDTA o omogenati di tessuto. La componente eritrocitaria del sangue è stata lisata tramite aggiunta di 1 ml di H_2O_{DEPC} a 4°C. Dopo centrifugazione si

è proceduto alla purificazione dell'RNA tramite Trizolo e precipitazione in isopropanolo.
Il rilevamento del TOV è stato eseguito tramite reazione One-step RT-PCR Real time utilizzando il kit SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen). La reazione amplifica una regione del segmento 10 come descritto da Hofmann et al. 2008 [2]. L'analisi della sequenza è stata eseguita dopo amplificazione di un frammento di 281 nt del segmento 2.

RISULTATI

Identificazione di un animale infetto TOV

Nel corso dell'indagine sieroepidemiologica sono stati identificati animali sieropositivi in 9 aziende, ma solo in un allevamento caprino della provincia di Como è stato possibile identificare la presenza di TOV.
I campioni sono stati testati per la ricerca di anticorpi verso BTV tramite ELISA e per la ricerca di Toggenburg orbivirus tramite RT-PCR real time. Un campione è risultato positivo ad entrambe le tecniche. Queste metodiche non sono, però, in grado di distinguere tra TOV e i sierotipi più comuni di BTV.

Caratterizzazione genetica

Tramite l'analisi di sequenza di una regione di 281 nt del segmento 2, che presentava un'elevata percentuale di omologia con i ceppi rilevati sul territorio svizzero, è stato possibile confermare la presenza di Toggenburg orbivirus nel campione positivo.

Infezione sperimentale

Gli animali infettati non hanno manifestato sintomi clinici riferibili a bluetongue durante la sperimentazione.
Capre: le capre inoculate sia nella prima infezione sperimentale sia nella seconda hanno sieroconvertito rispettivamente a 24, 31 e 19 gg P.I. ed hanno mantenuto titoli elevati fino alla fine della sperimentazione. L'RNA virale è stato rilevato in RT-PCR real time a partire da 11-12 gg P.I. per 16 settimane. La capra sacrificata non mostrava alterazioni patologiche riferibili a bluetongue. E' stata riscontrata un'elevata carica di RNA virale negli organi prelevati e una minore quantità nel sangue. Tutti i campioni inoculati nelle colture cellulari, nelle UEP e nei topini neonati hanno dato esito negativo.
Pecore*:* la positività virologica è stata evidenziata unicamente a 19 gg P.I. soltanto in una delle due pecore infettate. Questa ha sieroconvertito a 27 gg P.I. e gli anticorpi sono stati rilevati per tutta la durata della sperimentazione.
Bovino: è risultato sempre negativo alla ricerca sia per anticorpi sia per RNA virale.

DISCUSSIONE

L'indagine svolta in Italia ha evidenziato la presenza di TOV in un allevamento caprino della provincia di Como, indicando, unitamente al riscontro di positività sierologica in altre 8 aziende,una possibile diffusione di questa variante apatogena di BTV anche sul territorio italiano in un'area geografica confinante con la Svizzera.
Stante il mancato isolamento virale ed il limitato quantitativo di materiale patologico disponibile, una prima infezione sperimentale in capra ha consentito di amplificare e replicare *in vivo* il TOV. Con la successiva infezione si è voluto, quindi, verificare la trasmissibilità dell'infezione alle pecore ed ai bovini.
In tutti gli animali infettati non sono stati osservati segni clinici riferibili a bluetongue e, sebbene nelle pecore siano state in precedenza descritte lesioni quali emorragie nella parete dell'arteria polmonare ed endocardiche e petecchie sulla superficie epicardica [1], si è deciso di non sacrificare le pecore infettate, per verificarne la presenza. Le capre inoculate hanno presentato una risposta anticorpale, evidenziabile con le tre metodiche ELISA impiegate, mentre l'RNA virale è stato rilevato per un periodo relativamente lungo. Soltanto una delle due pecore, invece, dopo una breve viremia, ha sieroconvertito e gli anticorpi sono stati rilevati per l'intera durata della sperimentazione. Questo potrebbe essere dovuto ad una minor sensibilità di specie. I bovini sembrano non essere suscettibili all'infezione. Le colture cellulari sia di mammifero sia di insetto, le UEP ed i topini neonati, normalmente impiegati per l'isolamento dei sierotipi di BTV, non sono risultati idonei per l'isolamento di TOV.
Nonostante non sia stata ancora chiarita precisamente l'epidemiologia e la patogenesi di TOV è ipotizzabile che i piccoli ruminanti giochino un ruolo nel mantenimento dell'infezione. Inoltre, dato che le capre infette da TOV non manifestano sintomi clinici e che la metodica impiegata nella maggior parte dei laboratori non è in grado di differenziare TOV dai più comuni sierotipi di BTV, è possibile che TOV abbia circolato nella popolazione caprina già da diverso tempo.
La definizione delle caratteristiche epidemiologiche dei ceppi riscontrati necessita di ulteriori studi, ma il ritrovamento di TOV in una capra in provincia di Como suggerisce che il riscontro di positività sierologiche verso BTV debba essere meglio indagato.

BIBLIOGRAFIA

1. Chaignat V., Worwa G., Scherrer N., Hilbe M., Ehrensperger F., Batten C., Cortyen M., Hofmann M., Thuer B. (2009) "Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep". Vet Microbiol. Jul 2; 138(1-2):11-9. Epub 2009 Feb 11.
2. Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G. and Thuer B. (2008) "Genetic characterization of Toggenburg Orbivirus (TOV) as a tentative 25th serotype of bluetongue virus, detected in goats from Switzerland". Emerg. Infect. Dis. 14: 1855–1861.
3. Mertens PP, Arella M, Attoui H, Belloncic S, Bergoin M, Boccarado G, et al. Reoviridae. In: van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al., editors. Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press; 2000. p. 408–80.
4. Schwartz-Cornill I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, et al. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. Vet Res. 2008;39:46.
5. World Organisation for Animal Health (OIE) (2008). – Bluetongue, Chapter 2.1.3. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th Ed. OIE, Paris.

FATTORI DI RISCHIO PER LA DISTRIBUZIONE DI *CULICOIDES* SPP. IN PIEMONTE E RELAZIONE CON LE POSITIVITÀ PER BLUE TONGUE SIEROTIPO 8

Radaelli M.C.[1], Chiavacci L.[1], Barbaro A.[1], Travaglio S.[1], Masoero L.[2], Accorsi A.[3], Goria M.[4], Monnier M.[4], Vitale N.[1]

[1] S.S. Osservatorio Epidemiologico , I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

[2]S.C. Virologia, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

[3]S.C. Sezione Provinciale di La Spezia e Imperia, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

[4]S.C. Biotecnologie, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Keywords: *Culicoides,* BTV8, mappa del rischio

SUMMARY

Last year a Blue Tongue breakdown, due to BTV serotype 8, occurred for the first time in Piedmont region (North-western Italy) and different cattle herds were involved.

The aim of this study is to investigate the factors impacting upon the distribution of *Culicoides* spp. and the relationship between vector abundance and the occurrence of BTV8.

INTRODUZIONE

La Blue Tongue (BT) è una malattia infettiva non contagiosa che colpisce i ruminanti domestici e selvatici, causando gravi restrizioni alle movimentazioni degli animali infetti e dei loro prodotti. È sostenuta da un Orbivirus trasmesso dalla puntura di piccoli insetti ematofagi appartenenti alla specie *Culicoides* spp., e la sua diffusione è condizionata da componenti ambientali e climatiche [1, 4].

In Piemonte è assente il principale vettore diffuso nel bacino mediterraneo: *C. imicola*, ma è comprovata la diffusione di altri vettori competenti che appartengono a *C. Obsoletus Complex* e *C. Pulicaris Complex;* questi hanno già evidenziato spiccata affinità per il sierotipo BTV8 [3], nonché peculiare adattamento a condizioni territoriali simili a quelle di numerose aree della Regione, tanto da essere ritenuti responsabili della circolazione virale verificatasi nella provincia di Cuneo nella tarda estate dello scorso anno. Le positività (sierologiche e virologiche) hanno coinvolto alcune aziende di piccole dimensioni localizzate in un'area pedemontana a bassa densità zootecnica, che sfruttano i terreni praticando l'allevamento a stabulazione libera con accesso diretto dei bovini alla vegetazione boschiva, nella finalità principale di mantenere sgombro il sottobosco.

Lo scopo di questo lavoro è analizzare le positività per Blue Tongue emerse nel corso del 2008, in relazione a fattori quali uso del suolo, altimetria e temperature, che condizionano la diffusione dei vettori sul territorio piemontese.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati i dati delle catture entomologiche effettuate dalle trappole nel periodo da agosto 2001 a dicembre 2008. Le raccolte sono state cronologicamente suddivise in quattro stagionalità per anno; per gli insetti è stato operato il riconoscimento di specie, confermato dal Centro di Referenza di Teramo che ha reso disponibili i risultati nel proprio Sistema Informativo.

L'analisi è stata realizzata con il software statistico SAS®. I fattori di rischio esaminati per la presenza di *Culicoides* sono stati: temperatura media, minima, massima e stagionalità delle catture; uso del suolo, altimetria e posizione geografica delle località sede delle trappole.

La regressione logistica è stata utilizzata per valutare il peso delle variabili considerate, al fine di predire la presenza di vettori. L'output della regressione logistica è stato impiegato per creare delle mappe di rischio, realizzate con ARCGIS. Su queste mappe sono state evidenziate le aree a maggior rischio per la presenza di vettori e gli allevamenti sede di positività, che si inseriscono perfettamente in tali aree.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati analizzati sono relativi alle 7139 catture effettuate in Piemonte nel corso degli anni dal 2001 al 2008**.** Il modello ha individuato 3 fattori come maggiormente legati alla presenza di vettori: altitudine (alt >600 mt OR=7.86; IC 95% 6.16-10.04), uso del suolo (prati stabili vs altro OR=6.477; IC 95% 5.03-8.33) e temperatura minima (OR=1.21; IC 95% 1.19-1.22). La temperatura interagisce con l'altimetria: nel modello senza temperatura minima l'altimetria presenta valori di OR dimezzati (alt >600 mt OR=3.97; IC 95% 3.27-4.81). Le temperature medie e massime non sono risultate staticamente significative. Erano largamente previsti sia il dato sulla temperatura minima (più si abbassa la temperatura e minore è la presenza di *Culicoides*), che la relazione tra altimetria e temperatura minima. Dall'elaborazione dei dati di cattura relativi al biennio 2006-2007 di un precedente lavoro [2], erano risultati significativi solo uso del suolo e altimetria e non temperatura. Questa discrepanza trova spiegazione nel fatto che trattandosi di temperature, i dati acquistano una certa solidità solo se analizzati su lunghi periodi.

Secondo il modello, i *Culicoides* presenti sul territorio si localizzano e concentrano di preferenza nelle aree pre-collinari e pedemontane ricoperte da vegetazione incolta. La comparsa dei focolai di BTV8 nell'area del cuneese con queste caratteristiche, ha validato il modello e la mappa di rischio. Gli allevamenti infetti sono risultati 16 (3.77%, IC 095% 2.1%-6.1%) su un totale di 424 aziende testate.

I dettagli relativi sono riportati nella tabella sottostante.

Variabile	Totale	Media	LC inferiore 95% per la media	LC superiore 95% per la media
Prevalenza intrallevamento	-	0.37	0.23	0.51
Capi positivi	77	4.81	2.69	6.95
Capi provati	774	48.38	1.64	95.11

Da quanto emerge le aree di pianura, dove si concentra il patrimonio zootecnico regionale, svelano minor rischio per la presenza di vettori; a conferma di ciò, nonostante la densità zootecnica elevata, tali zone rimangono tuttora indenni da infezione.

Questo lavoro suggerisce che le trappole attualmente distribuite sul territorio regionale siano poco adatte per numero e localizzazione a coprire adeguatamente le varietà geografiche e ambientali della realtà piemontese. Sulla scorta della valutazione delle situazioni particolarmente a rischio, si è convenuto di incrementarne il numero, per intensificare le rilevazioni soprattutto in quei contesti dove per predisposizione territoriale e presenza di animali i *Culicoides* trovano idonei habitat vitali e riproduttivi.

BIBLIOGRAFIA

1. K. Mintiens, E. Méroc, P. S. Mellor, C. Staubach, G. Gerbier, A. R. W. Elbers, G. Hendrickx, K. de Clercq. Possible routes of introducton of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the epidemic in north-western Europe. Preventive veterinary Medicine 2008.
2. M. C. Radaelli, L. Chiavacci, A. Barbaro, S. Travaglio, A. Accorsi, N. Vitale. "Fattori di rischio per la diffusione di Culicoides spp. in Piemonte" Atti IV Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria (2008).
3. C. Saegerman, D. Berkyens, P. S. Mellor. Bluetongue Epidemiology in European Union. Emerging Infectious Diseases. Vol. 14 No. 4, April 2008.
4. I. Schwartz-Cornil, P. P. C. Mertens, V. Contreras, B. Hemati, F. Pascale, E. Bréard, P. S. Mellor, N. J. MacLachlan, S. Zientara. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. Review article. Vet. Res. (2008) 39:46.

METODI *IN VITRO* ALTERNATIVI ALLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE: PRINCIPI, ASPETTI REGOLATORI ED APPLICAZIONI

Dacasto M.

Area di Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria, Università di Padova, Agripolis Legnaro (PD)

Key words: *in vitro* methods, toxicology

In vitro methods (IVM) are commonly and widely used for the assessment of xenobiotics general toxicity, the characterization of their mechanism of action as well as to investigate their metabolism (i.e., bioactivation). After a short introduction, IVM general features, basic concepts about IVM validation process and, finally, some examples of IVM usefulness in toxicological sciences are reported.

Introduzione. L'avvento delle metodologie che permettono di studiare nella sua totalità il genoma, il proteoma nonché il metaboloma dell'individuo (tecnologie "*omics*") ha ampliato le conoscenze relative agli effetti degli xenobiotici sugli organismi viventi, sebbene in ambito tossicologico lo sviluppo di tali tecniche sia stata più lenta rispetto ad altre discipline biomediche. Analogamente, l'utilizzo dei metodi *in vitro* (MIV) nelle scienze farmaco-tossicologiche ha assunto un'importanza rilevante solo negli ultimi venti anni, nonostante l'ampia disponibilità di modelli semplificati. Attualmente, i MIV vengono impiegati nello screening preliminare dei farmaci nonché nella valutazione del rischio che consegue all'esposizione a sostanze tossicologicamente rilevanti (8, 12). Contestualmente all'uso dei MIV in fase di screening, sono stati intrapresi studi di validazione volti a sostituire tests condotti su animali *in vivo* (i.e., il test di irritazione oculare di Draize). Storicamente, tale iniziativa si riconduce alla cosiddetta strategia delle 3R ("*R*educe*, R*eplace*, R*efine") di Russell e Burch (1959). In questo breve lavoro vengono riportati alcuni concetti generali sui MIV, agli aspetti regolatori che ne disciplinano l'uso, nonché alcuni esempi di applicazione, nelle scienze farmaco-tossicologiche, di tali metodi, riconducibili all'attività di ricerca svolta dall'Autore.

Generalità sui MIV. I modelli *in vitro* attualmente disponibili per gli studi tossicologici sono molteplici. La maggior parte di questi sono linee cellulari stabilizzate, spesso di origine neoplastica (i.e., MCF-7, una linea cellulare di adenocarcinoma della mammella; Caco-2, ottenuta da un carcinoma colon-rettale dell'uomo). Sebbene rappresentino vere e proprie unità viventi organizzate, le linee cellulari rappresentano un sistema più semplificato rispetto all'organismo *in toto.* Tra gli altri modelli cellulari, che tanto per caratteristiche intrinseche quanto per complessità delle condizioni di coltura richieste per il loro mantenimento sono più rappresentativi di quanto avviene normalmente *in vivo*, si annoverano le cellule in sospensione, le colture primarie, le co-culture, le colture di organo e/o tessuto e le fettine ("slices") di tessuto (i.e. di fegato), In particolare, nelle co-culture e nelle fettine di tessuto sono contestualmente presenti quelle popolazioni cellulari normalmente riscontrabili nel tessuto *in vivo*. Un discorso a parte meritano le cellule ingegnerizzate geneticamente e quelle staminali. L'introduzione, in linee cellulari stabilizzate, di specifici cDNA e/o di sequenze promotrici e la loro conseguente espressione transiente o permanente ha aperto nuove prospettive di applicazione nelle scienze farmaco-tossicologiche. Un esempio di tale applicazione è il CALUX test. Le cellule staminali sono già state utilizzate per la messa a punto di un saggio *in vitro* per la valutazione del potenziale teratogeno di taluni xenobiotici; nondimeno, alcune evidenze sperimentali suggeriscono una migliore caratterizzazione di tali cellule prima del loro utilizzo su vasta scala (5, 13). L'utilizzo dei MIV comporta molteplici vantaggi: *in primis*, essendo sistemi semplificati e riproducibili richiedono una metodologia di esecuzione altrettanto semplice; quindi, permettono l'identificazione di danni precoci, seppur utilizzando piccole quantità di xenobiotico; il loro utilizzo richiede un budget contenuto, ma garantisce risultati in tempi brevi e permette l'allestimento di repliche sperimentali; infine, fatto più rilevante, comporta una riduzione dell'uso degli animali da esperimento, in accordo con la Direttiva comunitaria 86/609 e con la filosofia delle 3R. Tali metodi non costituiscono tuttavia la panacea di tutti i mali: in quanto semplificati, questi modelli non sono del tutto rappresentativi di quanto può avvenire *in vivo*, anche per le diverse condizioni di esposizione allo xenobiotico; sono utilizzabili essenzialmente per studi di tossicità acuta (i.e., screening) ma non cronica (i.e., cancerogenesi, genotossicità); l'estrapolazione *in vivo* dei dati ottenuti *in vitro* è spesso difficile; infine, non è possibile valutare la rilevanza di taluni effetti tossici mediati (i.e. ormoni, sistema immunitario). La scelta del MIV utilizzabile dipende dall'obiettivo che ci si prefigge: se si deve eseguire uno screening tossicologico, le linee cellulari stabilizzate (i.e., cellule HeLa, V79, CHO, Balb 3T3, BHK21) rappresentano una scelta ottimale. I parametri di tossicità misurabili sono generali ed indicativi di alterazioni della struttura o di particolari funzioni della cellula (i.e., la riduzione della vitalità cellulare; l'inibizione della capacità proliferativa; alterazioni metaboliche e/o morfologiche). Generalmente, i saggi messi in atto sono semplici e di rapida esecuzione; spesso, vengono sottoposti a procedure di convalida (estrapolazione *vitro-vivo*). Se, invece, si intende studiare il meccanismo d'azione dello xenobiotico in quel determinato tessuto, è preferibile ricorrere all'utilizzo di colture primarie o di particolari linee cellulari stabilizzate (i.e., HT-29, Caco-2, MCF7). La linea cellulare Caco-2 rappresenta un ottimo modello di assorbimento attraverso la barriera intestinale, mentre la MCF7 è la linea cellulare più utilizzata negli studi relativi al tumore mammario ormono-dipendente dell'uomo. Nelle scienze farmaco-tossicologiche assume particolare rilevanza anche lo studio del metabolismo degli xenobiotici, a seguito del quale si possono originare metaboliti dotati di minore o maggiore (bioattivazione) attività farmacologica o tossicologica. Essendo il fegato il principale organo preposto al metabolismo degli xenobiotici, tali studi vengono condotti utilizzando linee cellulari stabilizzate di epatoma (i.e., HepG2), fettine di fegato, colture primarie di epatociti (conservabili o meno in azoto liquido) e vettori di espressione eterologhi ingegnerizzati con il cDNA di enzimi farmaco-metabolizzanti (5, 8, 13). Occorre infine sottolineare l'importanza che a livello regolatorio sta assumendo l'utilizzo congiunto della tossicogenomica e dei MIV nell'individuazione di nuovi biomarcatori molecolari di tossicità (3).

Aspetti regolatori. Ogni anno, circa 75 milioni di animali vengono impiegati a scopo sperimentale, e di questi circa 10 milioni solo in Europa. Un rapporto della commissione europea preposta alla stima del numero globale di animali utilizzati per l'esecuzione di studi tossicologici e di valutazione del rischio riporta che il 61% di questi viene impiegato nella ricerca bio-medica ed il 15% in quella dell'ambiente, il 12% nell'industria, il 10% nell'agricoltura, il 2% a scopo didattico e solo l'1% nella cosmesi dermatologica. Se si considera invece la tipologia di

test tossicologico, il 35%, 17%, 13% e 10% degli animali da esperimento *in toto* vengono rispettivamente utilizzati nei tests di tossicità acuta, cronica, dello sviluppo e ripetuta (1, 10). Nella seconda parte del secolo scorso, la comunità scientifica prese coscienza del fatto che esistevano motivi etici, scientifici (i.e., differenze di specie che condizionavano l'estrapolazione dei dati ottenuti dall'animale all'uomo) ed economici a favore dell'adozione di metodi alternativi alla sperimentazione animale. Da allora, con l'aggettivo alternativo si intendono tutte le metodologie in grado di ridurre l'uso degli animali a scopo sperimentale (*R*educe), che ne evitano del tutto l'utilizzo (*R*eplace) o che provochino comunque una riduzione della loro sofferenza (*R*efine). Le principali norme di riferimento in materia di metodi alternativi, indirettamente recipienti la filosofia delle 3R, sono la direttiva comunitaria 86/609/CEE, che unifica le disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative di ciascun Stato Membro in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici, ed il decreto legislativo di attuazione di tale direttiva (DL 116 del 27/01/1992). Il nodo cruciale del dibattito sull'uso dei metodi alternativi è rappresentato dalle posizioni delle organizzazioni animalistiche e degli ambienti legati alla ricerca ed allo sviluppo in ambito tossicologico. Il progetto europeo *Anim*al *Al*ternatives: *S*cientific and *E*thical *E*valuation, finanziato nell'ambito del V Programma Quadro, ha riesaminato il modello delle 3R alla luce dei recenti progressi ottenuti dalla comunità scientifica, in modo da fornire elementi di chiarificazione al dibattito in corso e rendere possibile un approccio alla problematica della sperimentazione animale condiviso da tutte le discipline/ soggetti coinvolti. A livello comunitario è stata inoltre creata una piattaforma (*E*uropean *C*onsensus *P*latform on 3R-*A*lternatives, ECOPA, http://www.ecopa.eu) che ha come principale obiettivo lo sviluppo, la validazione e l'uso di metodi alternativi; in essa sono equamente rappresentate le istituzioni governative, l'università e/o i centri di ricerca, l'Industria e le associazioni animalistiche (10). Alcuni Stati Membri hanno già costituito piattaforme nazionali analoghe, le cui attività vengono coordinate da ECOPA; la piattaforma italiana (IPAM, *I*talian *P*latform on *A*lternative *M*ethods, http://www.ipamitalia.it) è stata fondata nel 2003. Come già sottolineato, i MIV sono comunemente usati nella ricerca di base; discorso più complesso è quello relativo allo sviluppo e alla validazione di saggi alternativi in grado di sostituire i metodi *in vivo* richiesti da normative nazionali ed internazionali. L'*E*uropean *C*enter for the *V*alidation of *A*lternative *M*ethods (ECVAM, http://ecvam.jrc.it) coordina a livello comunitario il processo di validazione, e costituisce un Ente di riferimento per tutti coloro che concorrono allo sviluppo ed al riconoscimento internazionale dei metodi alternativi. Il processo di validazione (che può durare sino a 10 anni) è essenzialmente volto ad accertare l'affidabilità e la rilevanza del saggio proposto. Consultando il sito web di ECVAM (in particolare, il *T*racking *S*ystem for *A*lternative test methods *R*eview, Validation and Approval, TSAR) ci si può fare un'idea delle fasi in cui si articola tale processo e vedere l'elenco dei saggi già convalidati ed inseriti nella legislazione comunitaria o sul punto di esserlo; tra questi, tests di corrosività cutanea (EpiSkin™, EpiDerm™ e CORROSITEX™), di fototossicità (3T3 NRU phototoxicity test), di sensibilizzazione cutanea (Local Lymph Node Assay, LLNA) e di embriotossicità (Embrionic stem cell test, EST, Micromass embryotoxicity assay, MM, Whole rat embryo embryotoxicity assay, WET).

Applicazioni. Un classico esempio dell'utilità delle linee cellulari stabilizzate nello screening tossicologico è la valutazione degli effetti citotossici del verde malachite (VM, un fungicida) nonché del suo principale metabolita (il leucomalachite, LM), in due linee cellulari stabilizzate, le Caco-2 e le HEp-2; queste ultime sono risultate essere più sensibili agli effetti citotossici del VM, più rilevanti di quelli indotti dal LM (11). La maggiore tossicità che taluni xenobiotici palesano nei confronti di un particolare tessuto può essere definita ricorrendo all'utilizzo di colture primarie. L'acetato di trifenil stagno (TPTA) è uno stannorganico utilizzato in agricoltura come biocida. La presenza di concentrazioni µmolari di TPTA nel *medium* di colture primarie di timociti murini determina citotossicità, riduce la percentuale di $CD4^+$ e $CD8^+$ ed inibisce la proliferazione cellulare; il meccanismo d'azione alla base degli effetti summenzionati è la comparsa, a seconda delle dosi impiegate, di apoptosi precoce, tardiva o di necrosi (2, 6). Le colture primarie di epatociti sono di gran lunga il metodo *in vitro* più utilizzato negli studi sul metabolismo degli xenobiotici; nel coniglio, l'attività degli enzimi biotrasformativi è misurabile sino a 72 ore (7), e tali colture sono state impiegate con successo per caratterizzare il profilo metabolico di uno dei più importanti antibiotici usato in chemioterapia veterinaria, la tilmicosina (9), nonché per evidenziare l'effetto modulante del sistema immunitario sulle biotrasformazioni (4).

Riferimenti bibliografici.

1. Baumans, V. (2006). Alternatives to the use of laboratory animals in veterinary education. ALTEX 23 (Spl.), 68-70.
2. Bollo, E., Guglielmino, R., Sant, S., Pregel, P., Riondato, F., Miniscalco, B., Cornaglia, E., Nebbia, C., Dacasto, M. (2006). Biochemical, ultrastructural and molecular characterization of the triphenyltin acetate (TPTA)-induced apoptosis in primary cultures of mouse thymocytes. Cell Biol Toxicol 22, 275-284.
3. Borlon, C., Godard, P., Eskes, C., Hartung, T., Zuang, V., Toussaint, O. (2007). The usefulness of toxicogenomics for predicting acute skin irritation on in vitro reconstructed human epidermis. Toxicology 241, 157-166.
4. Calleja, C., Eeckhoutte, C., Dacasto, M., Larrieu, G., Dupuy, J., Pineau, T., Galtier, P. (1998). Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultured rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6β-hydroxylation. Biochem Pharmacol 56, 1279-1285.
5. Carere, A., Stammati A., Zucco, F. (2002). In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. Toxic In Vitro 127, 153-160.
6. Dacasto, M., Cornaglia, E., Nebbia, C., Bollo, E. (2001). Triphenyltin acetate-induced cytotoxicity and $CD4^+$ and $CD8^+$ depletion in mouse thymocyte primary cultures. Toxicology 169, 227-238.
7. Eeckhoutte, C., Giuliano Albo, A., Carletti, M., Rossetto Giaccherino, A., Galtier, P., Nebbia, C., Dacasto, M. (2002). Time-dependent variations of drug-metabolizing enzyme activites (DMEs) in primary cultures of rabbit hepatocytes. Toxic In Vitro 16, 375-382.
8. Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. Food Chem Toxicol 40, 193-236.
9. Montesissa, C., Capolongo, F., Santi, A., Biancotto, G., Dacasto, M. (2004). Metabolism of tilmicosin by rabbit liver microsomes and hepatocytes. Vet J 167, 87-94.
10. Rogiers, V. (2005). Recent developments in the way forward for alternative methods: formation of national consensus platforms in Europe. Toxicol Appl Pharmacol 207, S408-S413.
11. Stammati, A., Nebbia, C., De Angelis, I., Giuliano Albo, A., Carletti, M., Rebecchi, C., Zampaglioni, F., Dacasto, M. (2005). Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. Toxic In Vitro 19, 853-858.
12. Walum, E., Hedander, J., Garberg, P. (2005). Reserach perpsectives fort he pre-screening alternatives to animal experimentation. On the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large set of chemicals. Toxicol Appl Pharmacol 207, S393-S397.
13. Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E., Stammati, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years later. Toxic In Vitro 18, 153-163.

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI SPECIE DI PROTOTHECA MEDIANTE REAL TIME PCR ASSOCIATA AD ANALISI DELLA CURVA DI MELTING

Ricchi M., Cammi G., Merenda M., Garbarino C., Belletti G.L. e Arrigoni N.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", Sezione di Piacenza

Key words: *Prototheca spp*., genotipizzazione, Real Time PCR

SUMMARY
Some algae species belonging to the genus *Prototheca* are able to induce persistent infections both in human and in animals. The most important infection in animals is bovine mastitis. So far, efficient therapies are not available against these organisms. The knowledge of the species involved could be essential for the outbreak management in dairy herds. For this purpose we developed a simple and rapid tool to differentiate *P. zopfii* (genotype 1 and 2), *P. blaschkeae* and *P. wickerhamii*. This method is based on a Real Time PCR technique coupled with DNA melting resolution analysis.

INTRODUZIONE

Le alghe prive di clorofilla appartenenti al genere *Prototheca* furono descritte per la prima volta da Kruger nel 1894 (1).
Il genere P*rototheca* attualmente comprende 5 specie diverse: *P. stagnora, P. ulmea, P. wickerhamii*, *P. zopfii* e *P. blaschkeae* (2, 3). La classificazione di una sesta specie, *P. moriformis* non è universalmente riconosciuta (3). Sulla base di alcune osservazioni biochimiche e sierologiche, nonché sul confronto fra le sequenze di RNA ribosomiale 18S, *P. zopfii* è attualmente differenziata nei genotipi 1 e 2 (3).
Al genere *Prototheca* appartengono organismi vegetali ampiamente diffusi nell'ambiente, dove prediligono habitat umidi e ricchi di sostanza organica. Le specie *P. zopfii, P. blaschkeae* e *P. wickerhamii*, in presenza di un sistema immunitario compromesso (4) e/o di scarsa igiene (5), possono causare infezioni persistenti nell'uomo e negli animali.
Mentre le infezioni che colpiscono l'uomo sono prevalentemente associate a *P. wickerhamii* (4), la mastite bovina, la prototecosi più comune negli animali, può essere indotta sia da *P. zopfii* (3) che da *P. blaschkeae* (6).
Le segnalazioni di mastiti bovine associate a Prototheca sono in aumento (6) e, per il momento, non sono disponibili terapie efficaci (7). Sino ad ora tutti i casi di mastite bovina causati da *P. zopfii* sono stati associati al genotipo 2 (8), mentre il genotipo 1, pur essendo ampiamente diffuso nell'ambiente, non sembra rivestire un ruolo patologico. Identificare il genotipo coinvolto (*P. zopfii* genotipo 1 e 2 o *P. blaschkeae*) risulta quindi fondamentale per interpretare gli isolamenti ambientali di Prototheca, individuare la principale fonte di infezione e adottare gli opportuni provvedimenti gestionali nell'allevamento colpito (3, 6). La caratterizzazione molecolare di *P. blaschkeae* e dei due genotipi di *P. zopfi* può essere effettuata sia mediante PCR genotipo specifica (3) che mediante Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (8). La PCR genotipo specifica richiede tre differenti master mix e due corse di PCR per ciascun campione, mentre l'analisi RFLP richiede la manipolazione dei campioni dopo PCR, con aumento sia del rischio di contaminazione che dei tempi di analisi.
Le sequenze di RNA ribosomiale 18S di *P. zopfii* genotipo 1, *P. zopfii* genotipo 2, *P. blaschkeae* e *P. wickerhamii* differiscono per poche basi. Poiché la temperatura di melting (T_m) riflette la lunghezza e la composizione in basi delle oligo sequenze, comparare sia la temperatura di melting che la forma della curva può essere uno strumento molto utile per discriminare anche sequenze con poche differenze in termini di basi (9). Scopo di questo studio è stato quello di sviluppare una metodica Real Time PCR accoppiata con analisi della temperatura di melting degli ampliconi prodotti. Durante l'ottimizzazione del protocollo, abbiamo valutato cinque master mix commerciali e una mix sviluppata aggiungendo LC Green® ad una master mix commerciale priva di coloranti fluorescenti. Ciascuna mix conteneva uno dei seguenti coloranti fluorescenti (SYBR® Green I, EVAGreen™ and LC Green®).

MATERIALI E METODI

I ceppi 2063 (*P. zopfii* genotipo 1), 2021 (*P. zopfii* genotipo 2), 263-11 (*P. wickerhami)* e 2064 (*P. blaschkeae)* provenivano dal Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG, Göttingen, Germania).
Le alghe sono state coltivate in Sabouraud Dextrose Agar per 48 ore a 30 °C. Le cellule algali sono state risospese in 100 µl di acqua sterile distillata e omogeneizzate con 100 mg di biglie di vetro in TissueLyzer (Qiagen, Milano, Italia) per 5 min a 30 Hz. Il DNA è stato estratto con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia) come precedentemente descritto (3). Il DNA è stato quantificato a 260 nm e diluito per amplificare 10 ng totali. I primers sono stati disegnati per amplificare una regione comune a tutte le *Prototheca spp.* utilizzate in questo studio, utilizzando AlleleID (versione 7.01, Premier Biosoft International, USA). Le sequenze dei primers erano: 5'- CTTGTCAGGTTGATTCC-3' (senso) e 5'-AGCAGTCCCTCTAAGAAG-3' (antisenso). Per le reazioni di PCR abbiamo utilizzato le seguenti master mix: EVAGreen™ qPCR GreenMaster with ROX (JenaBiosciences, Jena, Germania), LCGreen Plus® Dye High Sensitivity Genotyping Master Mix (Idaho technology Inc, Salt Lake City, Utah, USA). Abbiamo utilizzato anche tre mix con SYBR® Green I: *Power* SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems,Milano, Italia), iQ SYBR Green Supermix (Biorad, Milano, Italia) e Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Inter. Inc., Burlington, CA). Inoltre abbiamo utilizzato una mix preparata addizionando LCGreen® Plus+ Melting Dye (Idaho technology Inc, Salt Lake City, Utah, USA) a Righ-Taq (EuroClone, Pero, Italia). Le reazioni sono state effettuate con StepOne Plus system (Applied Biosystems). Le condizioni erano: denaturazione/ attivazione a 95 °C da 3 a 10 min, sulla base della mix utilizzata, seguita da 35 cicli con 15 sec di denaturazione, 30 sec di annealing a 53 °C e 30 sec di estensione a 65 °C. Gli ampliconi sono stati immediatamente processati portandoli a 95 °C per 15 sec e di seguito a 60 °C per 1 min. I campioni sono stati quindi riscaldati da 60 °C a 95 °C, incrementando la temperature di 0.3 °C per singolo step con una lettura per singolo step. La T_m è stata misurata dal software (StepOne Software v2.1, Applied Biosystems) senza normalizzare con ROX.
Per confermare le sequenze ottenute, abbiamo sia sequenziato gli amplificati con EVA Green utilizzando ABI Prism 3100 Avant Sequencer (Applied Biosystems) che processato i campioni con PCR genotipo specifica (3), modificata sostituendo il primer antisenso del controllo di amplificazione riportato nella metodica con 5'-AGCACACCCAATCGGTAGGA -3'.

RISULTATI

Dalla tabella 1 e dalla figura 1 si evince come la mix contenente EVAGreen™ e la mix contenente LCGreen Plus® Dye commerciale si siano rilevate le migliori, in quanto in grado di discriminare meglio tra le diverse specie e varianti di *Prototheca spp.* analizzate (maggiore differenza in termini di T_m e migliore distinzione fra i diversi profili delle curve). Le mix contenenti SYBR® Green hanno mostrato un potere discriminatorio complessivamente inferiore.
Sia la metodica PCR genotipo specifica che l'analisi delle sequenze confermano i risultati ottenuti sulla base della curva di melting.

	P. zopfii gen 1	***P. zopfii gen 2***	***P. blasch.***	***P. wicker.***
	T_m (°C)			
EVAGreen™ qPCR GreenMaster	84,75	83,82	86,09	80,81
LCGreen Plus® Dye Master Mix	89,08	88,25	89,82	84,86
Power SYBR®	82,26	81,27	82,86	78,66
iQ SYBR Green	85,24	84,55	85,93	81,78
Maxima™ SYBR Green	82,93	82,14	83,62	79,19
LCGreen® + Righ-Taq	88,73	87,67	89,32	84,56

Tabella 1: T_m delle varie specie di Prototheca in relazione alle master mix con relativi coloranti fluorescenti.

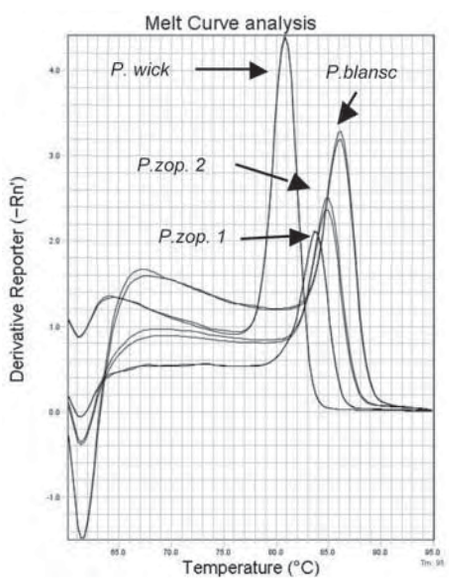


Figura 1: Curve di melting ottenute con EVAGreen™, espresse come derivate della fluorescenza in funzione della T° (dati in duplicato)

DISCUSSIONE

La letteratura suggerisce come l'incidenza delle mastiti bovine causate da Prototheca sia in aumento in tutto il mondo (3, 4, 6, 10). Se questo sia dovuto ad una più specifica ricerca di questo agente patogeno da parte dei laboratori o ad un aumento dell'incidenza reale non è ancora chiaro. La possibilità di conoscere rapidamente e con precisione la specie, o nel caso di *P. zopfii*, il genotipo che sostiene l'infezione, diventa di fondamentale importanza nella gestione del problema in allevamento. La metodica proposta, differenziando tra tutte le *Prototheca spp.* patogene, risulta funzionale all'interpretazione degli isolamenti ambientali e alla individuazione delle fonti probabili di infezione per i bovini.
Le tecniche attualmente in uso per la tipizzazione molecolare di *Prototheca spp.*, sebbene si siano rivelate precise ed accurate, rimangono piuttosto laboriose. La metodica da noi proposta presenta i vantaggi di essere semplice, molto veloce (circa 2 ore per effettuare l'amplificazione e l'analisi della curva di melting), relativamente poco costosa e di non richiedere manipolazioni successive all'allestimento della reazione di PCR. Inoltre, la metodica si è rivelata piuttosto robusta, in quanto mix con composizioni diverse, sia come coloranti fluorescenti che come enzimi, si sono rivelate in grado di discriminare fra le diverse specie di Prototheca, fornendo risultati tra loro sovrapponibili. Infine, poiché l'apparecchiatura utilizzata in Real Time non era specificatamente equipaggiata con sistemi High Melting Resolution, la metodica può essere alla portata di molti laboratori.

BIBLIOGRAFIA

1. Krüger W. 1984. Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Saftflusse der Laubbäume. Hedwigia XXXIII: 16-241.
2. Pore S. 1985. *Prototheca* taxonomy. Mycopathologia. 90: 187-189.
3. Roesler, U., Moller A., Hensel A., Baumann D., Truyen U. 2006. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *P. zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1419-1425.
4. Lass-Flörl C, Mayr A. Human protothecosis. 2007. Clin. Microbiol. Rev. 20: 230-242.
5. Jánosi S, Rátz F, Szigeti G, Kulcsár M, Kerényi J, Laukó T, Katona F, Huszenicza G. 2001. Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. Vet. Q.; 23: 58-61.
6. Marques S, Silva E, Kraft C, Carvalheira J, Videira A, Huss VA, Thompson G. 2008. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. J. Clin. Microbiol. 46: 1941-1945.
7. Buzzini P, Turchetti B, Branda E, Goretti M, Amici M, Lagneau PE, Scaccabarozzi L, Bronzo V, Moroni P. 2008. Large-scale screening of the in vitro susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. Med. Mycol. 46: 511-514.
8. Möller A, Truyen U, Roesler U. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? Vet. Microbiol. 120: 370-374.
9. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics. 8: 597-608.
10. Scaccabarozzi L, Turchetti B, Buzzini P, Pisoni G, Bertocchi L, Arrigoni N, Boettcher P, Bronzo V, Moroni P. 2008. Short communication: isolation of Prototheca species strains from environmental sources in dairy herds. J. Dairy Sci. 91: 3474-3477.

COMPARAZIONE GENOMICA DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE (VTEC) APPARTENENTI A DIVERSI SIERO-PATOTIPI

Imamovic L.[1, 2], Tozzoli R.[1], Michelacci V.[1], Marziano M.L.[1], Caprioli A.[1], Morabito S.[1]

[1]Laboratorio Comunitario e Nazionale di Referenza per Escherichia coli, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia;

[2]Dipartimento di Microbiologia, Facoltà di Biologia, Università di Barcellona, Barcellona, Spagna

Keywords: *Escherichia col*i, seropathotypes, microarrays

ABSTRACT

The sero-pathotype (ST) classification scheme classifies VTEC into five groups, from A to E, with a decreasing rank of pathogenicity. The objective of this study was to identify additional genetic markers which could characterize VTEC belonging to ST A and B, those of major concern for public health. The presence of 6176 translatable open reading frames (ORFs) of pathogenic *E. coli* O157 EDL 933 and Sakai strains was investigated using DNA arrays, in 18 *E. coli* strains belonging to ST B, C and D. The presence of 17 ORFs identified through this analysis was examined by PCR in additional 90 strains of *E. coli.*

INTRODUZIONE

I ceppi di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC) sono classificati in cinque siero-patotipi (ST), denominati con lettere alfabetiche dalla A alla E in base alla loro incidenza relativa, la capacità di causare episodi epidemici, la gravità della malattia che sono in grado di indurre e le caratteristiche di virulenza (1, 2). ST A comprende i ceppi VTEC O157:H7 ed O157:NM, ST B comprende i ceppi VTEC che appartengono ai cinque sierotipi più frequentemente associati alla malattia in tutto il mondo e soprattutto nei Paesi dell'Europa continentale (O26, O103, O111, O121, O145), mentre ST C raggruppa i sierotipi VTEC che vengono associati ad episodi epidemici con frequenza occasionale (2). Infine i sieropatotipi D ed E comprendono tutti quei ceppi VTEC che non sono in grado di indurre malattia grave nell'uomo e/o che sono adattati ad ospiti animali. L'obiettivo di questo lavoro consiste nella ricerca di determinanti genetici addizionali specificamente associati ai sieropatotipi più spesso coinvolti nelle forme aggravate di infezione da VTEC, mediante un approccio di comparazione dell'intero genoma.

MATERIALI E METODI

Ceppi Batterici

I ceppi VTEC utilizzati in questo studio sono parte della collezione dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS). I ceppi analizzati negli esperimenti microarray sono riportati in tabella 1. Lo screening per PCR è stato effettuato sul ceppo *E. coli* K12 MG1655, su 27 ceppi di *E. coli* non patogeni appartenenti alla collezione ECOR e su un totale di 62 ceppi VTEC, elencati nelle tabelle 2 e 3.

Estrazione genomica

Il DNA genomico è stato estratto mediante Genomic DNA Extraction Mini Kit (RBC Bioscience). Per gli esperimenti microarray sono stati utilizzati 2 µg dei campioni di DNA così preparati.

Esperimenti microarray

I campioni di DNA genomico sono stati marcati con i coloranti fluorescenti Cy3 e Cy5, rispettivamente per i ceppi da testare e i ceppi di controllo, e successivamente ibridati su vetrini per microarray disponibili in commercio (Ocimum Biosolutions *E. coli* O157 OciChip). Questi vetrini contengono 6176 oligonucleotidi, alcuni specifici per *E. coli* K12 MG1655, alcuni per il ceppo di *E. coli* O157:H7 EDL933 ed altri per il ceppo di *E. coli* O157:H7 detto VT2-Sakai (RIMD0509952). I controlli interni di ibridazione erano costituiti da una miscela dei tre ceppi di riferimento (MG1655, EDL 933 e VT2-Sakai). Dopo l'ibridazione, i vetrini sono stati scannerizzati con lo strumento ProscanArray (Perkin Elmer) e le immagini così ottenute sono state analizzate con il software Proscanarray, fornito in dotazione con lo scanner. La successiva visualizzazione ed elaborazione dei dati ottenuti è stata effettuata con il software TIGR Multiple Array Viewer.

Amplificazione mediante reazioni di PCR

Le reazioni di PCR sono state eseguite a partire da 5 µl di sospensione cellulare in un volume totale di 25 µl ciascuna utilizzando la BIOTAQ™ Red DNA Polymerase (Bioline) e successivamente analizzate su gel di agarosio colarati con bromuro di etidio.

RISULTATI

Comparazione genomica attraverso esperimenti di microarray

Un totale di 18 ceppi di *E. coli* facenti parte della collezione ISS (Tabella 1) e appartenenti a ST B, C e D (2) è stato sottoposto ad un esperimento pilota di comparazione genomica attraverso ibridazioni di vetrini microarray contenenti l'intero corredo genico dei ceppi *E. coli* O157 di riferimento, corrispondenti a ST A.

Tabella 1. Ceppi selezionati per la comparazione microarray con il sieropatotipo A (O157)

Ceppo	Sierotipo	Sieropatotipo	Origine
ED 56	O26	B	Bovina
ED 477	O26	B	Bovina
ED 567	O26	B	Umana, SEU*
ED 673	O26	B	Umana, SEU
ED 669	O26	B	Umana, SEU
ED 142	O111	B	Umana, SEU
ED 182	O111	B	Umana, SEU
ED 199	O111	B	Umana
ED 672	O111	B	Umana
ED 287	O103	B	Bovine
ED 172	O103	B	Umana
ED 566	O145	B	Umana, SEU
ED 645	O145	B	Umana, SEU
ED 226	O113	C	Umana, SEU
ED 230	O113	C	Umana
ED 76	O91	C	Umana, diarrea
ED 599	O91	C	Bovina
ED 372	O45	D	Piccione

* *Sindrome Emolitico Uremica*

L'analisi dei dati ottenuti ci ha permesso di identificare circa 50 ORF apparentemente conservate nei ceppi appartenenti a ST B ma non in quelli di ST C e D inclusi nello studio.

Analisi delle ORF conservate nei ceppi appartenenti a ST B

Diciassette ORF tra le 50 identificate apparivano consistentemente presenti nei ceppi appartenenti a ST B e

sono state quindi ricercate tramite analisi PCR in un pannello di ceppi VTEC appartenenti ai quattro diversi sieropatotipi (Tabelle 2 e 3), nei ceppi appartenenti alla collezione ECOR e nel ceppo MG1655. Le coppie di primers corrispondenti alle 17 ORF selezionate sono state elaborate presso l'ISS ed i risultati ottenuti mediante le reazioni di PCR eseguite sul pannello di ceppi testati sono riportati di seguito (Tabelle 2 e 3).

Tabella 2. Risultati dello screening PCR per le ORF associate al sieropatotipo B (parte 1)

Codice	O 157 (10)*	O 26 (9)	O 111 (10)	O 145 (7)	O 103 (5)	O121 (2)
Ecs3855	9** [a]	8 [b]	10	7	4	2
Ecs1332	10	8 [b]	10	7	2	2
Ecs1354	10	9	10	7	2	2
Z3933	10	9	10	7	5	2
Ecs1400	10	9	10	7	2	0
Ecs1516	10	9	10	2	2	2
Ecs2245	10	9	10	7	4	2
Ecs1321	10	9	10	7	2	2
Ecs1526	10	9	10	7	4	2
Ecs3846	10	6	10	6	2	2
Ecs2739	10	10	10	7	5	2
Ecs0811	10	8	10	7	5	2
Ecs1976	10	9	10	7	5	2
Ecs2634	10	9	10	4	4	2
Ecs2201	7	9	10	7	4	2
Ecs3854	10	9	10	7	4	2
Ecs2200	7	9	10	7	2	2

**numero totale di ceppi testati;*
*** numero di ceppi positivi;*
[a] 9 ceppi testati;
[b] 8 ceppi testati.

Tabella 3. Risultati dello screening per PCR delle ORF associate al sieropatotipo B (parte 2)

Codice	O 113 (9)*	O 91 (4)	O 23 (1)	O 121 (2)	Gr. D (5)	ECOR (27)	K12 (1)
Ecs3855	0**	0	0	2	0	0	nt
Ecs1332	1	1	0	2	0	4	nt
Ecs1354	2	0	0	2	1	0	nt
Z3933	1	0	0	2	5	0	nt
Ecs1400	0	0	0	0	5	9	0
Ecs1516	1	1	0	2	0	2	0
Ecs2245	3	4	0	2	0	9	0
Ecs1321	1	0	0	2	0	0	0
Ecs1526	1	0	0	2	5	0	0
Ecs3846	6	0	1	2	0	2	0
Ecs2739	5	2	1	2	0	9	0
Ecs0811	1	1	0	2	5	5	0
Ecs1976	1	1	0	2	5	3	0
Ecs2634	1	1	0	2	4	2	0
Ecs2201	0	0	0	2	0	0	0
Ecs3854	1	0	0	2	0	0	0
Ecs2200	0	0	0	2	0	0	0

**numero totale di ceppi testati;*
*** numero di ceppi positivi;*
nt – non testati.

In generale, le ORF ECs3846, ECs3854 and ECs3855, che si localizzano nell'isola di patogenicità (PAI) OI#122, risultavano consistentemente presenti negli isolati appartenenti ai sieropatotipi A e B. Questo risultato conferma le precedenti ipotesi sull'associazione dei geni di virulenza contenuti nell'OI#122 con i gruppi più frequentemente coinvolti nei casi umani di malattia (2, 3). Le ORF ECs2200 e ECs2201 sono state identificate nei ceppi appartenenti a ST A e B e nei ceppi di sierotipo O121, mentre l'ORF ECs1321 è stata rinvenuta, oltre a questi, anche nei ceppi di VTEC O113. Queste ORF sembrano quindi candidate per una ricerca su più ampia scala, allo scopo di confermare la loro associazione con i sieropatotipi A e B e quindi il loro possibile utilizzo come predittori di virulenza di questi due gruppi.

Tabella 4. Coppie di primers corrispondenti alle regioni ECs1321, ECs2200 e ECs2201 testate negli esperimenti di PCR

Nome del primer	Sequenza
ECs 1321 for	TGTCGGTCTGCTCACTGTTC
ECs 1321 rev	TCTCCAGACGGTTAGCGAGT
ECs 2200 for	GCTGAATGATTCCCATGTCA
ECs 2200 rev	ACCCACGAAAGAGCAGAACA
ECs 2201 for	AGCCTTATTTCGCAACCAGA
ECs 2201 rev	AAATGCCGGTAGTTCGTGAC

DISCUSSIONE

Esperimenti di microarray riportati in precedenza mostravano differenze all'interno di ST A (4) e tra ST A e ST B (5). In questo studio, la comparazione genomica tramite microarray di un più ampio pannello di ceppi VTEC corrispondenti ai diversi sieropatotipi ha portato all'identificazione di determinanti genetici caratteristici di quelli associati a malattia umana grave. Questi corrispondevano per lo più a elementi genetici mobili, come già riportato in precedenza riguardo a ST A (4) e ST A e B (5). I marcatori così identificati sono stati ulteriormente analizzati per la distribuzione in un numero più ampio di ceppi VTEC appartenenti a diversi ST. I risultati di questi esami hanno portato all'identificazione di marcatori specifici dei VTEC che fanno parte dei siero-patotipi di maggiore rilievo per la sanità pubblica, quali ST A e B. Questi marcatori potrebbero avere un risvolto pratico interessante come predittori di virulenza in saggi diagnostici. Inoltre, i risultati di questo studio potrebbero portare all'identificazione di nuovi meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi delle infezioni da VTEC.

BIBLIOGRAFIA

1. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 36:289-311
2. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. 2003. Association of genomic O island 122 of Escherichia coli EDL 933 with verocytotoxin-producing Escherichia coli seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 41:4930-40.
3. Morabito S, Tozzoli R, Oswald E, Caprioli A. 2003. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of Escherichia coli O157:H7 is frequently present in attaching and effacing E. coli. Infect Immun.; 71:3343-8.
4. Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T et al. 2006. Complexity of the genomic diversity in enterohemorrhagic Escherichia coli O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai OligoDNA microarray and the Whole Genome PCR scanning. DNA Res. 13:3-14.
5. Ogura Y, Ooka T, Asadulghani et al. 2007. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic Escherichia coli strains of O157 and non-O157 serotypes. Genome Biol. 8: R138

APPLICAZIONE DELLA PCR-RFLP PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI LARVE DI ANISAKIS ISOLATE DA PRODOTTI DELLA PESCA

Sciortino S., Palumbo P., Reale S., Macrì D., Costa A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri" Palermo

Key words: zoonotic disease, *Anisakis spp*., PCR-RFLP

SUMMARY

The aim of the present work was to investigate, using RFLP genetic analysis, the occurrence of larval forms of *Anisakis* spp. in teleost fishes and in cephalopods. A total of 125 *Anisakis* larvae were identified by PCR-RFLP from 9 teleost fish species and one cephalopod species captured in Sicily. The Type I larvae were identified as belonging to *A. pegreffii* (90.4%) and *A. simplex s.str.* (2.4%). The Type II larvae were all found to belong to *A. physeteris* (7.2 %). The results reported provide information regarding the diversity of *Anisakis* species in this area of the Mediterranean Sea.

INTRODUZIONE

Forme larvali di diverse specie appartenenti al genere *Anisakis* (Dujardin 1845) sono state documentate nei visceri e nella muscolatura di numerose specie ittiche, teleostei e molluschi cefalopodi di importanza commerciale nei mari italiani (5,8). L'uomo può infestarsi accidentalmente in seguito al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti, infestati da larve vive al 3° stadio o sottoposti a trattamenti (salagione, marinatura, affumicatura) che non siano stati idonei a devitalizzare le larve: la zoonosi conseguente (anisakiasi) è ben documentata da diversi autori (6). Le forme larvali di *Anisakis* possono essere identificate a livello di genere mediante lo studio dei caratteri morfologici al microscopio ottico: le larve L3 possono essere distinte morfologicamente in larve di Tipo I, caratterizzate dalla presenza di un mucrone all'estremità caudale e di Tipo II dove il mucrone è invece assente (1). Negli ultimi venti anni l'applicazione di metodi molecolari quali lo studio degli isoenzimi e, più di recente, di marcatori molecolari basati su PCR-RFLP nella regione genomica nucleare degli spaziatori del DNA ribosomale ITS1 e ITS2, più la regione codificante per la sub unità 5.8S, ha permesso una più precisa diagnosi differenziale delle specie di *Anisakis* coinvolte nell'anisakiasi umana (3,7). Gli studi genetici sui nematodi anisakidi hanno tra l'altro dimostrato che molte morfospecie considerate cosmopolite, quale *Anisakis simplex,* sono in realtà composte da più specie gemelle, caratterizzate da differente distribuzione geografica, ciclo biologico e preferenza per l'ospite (8). Attualmente in *Anisakis* Tipo I rientrano sei specie distinte (*Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis simplex C*, *Anisakis typica*, *Anisakis ziphidarum* e *Anisakis* sp A mentre in *Anisakis* Tipo II sono state descritte tre specie: *Anisakis physeteris*, *Anisakis brevispiculata* e *Anisakis paggiae* (5,8,9).
Obiettivo del nostro lavoro è stato quello di effettuare una identificazione molecolare di specie di forme larvali, già identificate morfologicamente come appartenenti al genere *Anisakis,* isolate da prodotti della pesca freschi (teleostei, molluschi cefalopodi), provenienti dalle coste siciliane, mediante analisi genetica PCR-RFLP, utilizzando le chiavi di lettura indicate in bibliografia (3,9). I frammenti di PCR amplificati sono stati inoltre sottoposti a sequenziamento.

MATERIALI E METODI

Un totale di 125 larve L3 di *Anisakis* sono state raccolte da differenti specie di teleostei e da una specie di molluschi cefalopodi, pervenuti presso il nostro laboratorio durante il periodo gennaio 2007- giugno 2009: i prodotti della pesca freschi esaminati, costituiti in particolare da campioni di spatola, suri, naselli e sgombri (Tab 1), provenivano da mercati ittici e pescherie di varie zone della Sicilia (Mazara del Vallo, Trapani, Sciacca, Messina), trasportati entro 24 ore e conservati a temperatura di refrigerazione. Le forme larvali, riferibili ad anisakidi osservate all'apertura dei pesci, sono state lavate in soluzione fisiologica, fissate in etanolo 70% ed identificate a livello di genere mediante microscopio ottico (2). Le larve identificate come appartenenti al genere *Anisakis,* sono state conservate in alcool etilico al 70% per la successiva identificazione molecolare.
Estrazione del DNA. Le larve sono state accuratamente lavate in acqua sterile, frammentate con un bisturi, quindi congelate a -20°C per 24 ore. Per l'estrazione degli acidi nucleici sono stati impiegati appositi kit che si basano sull'uso di colonnine di affinità (Gen Elute Mammalian Genomic DNA miniprep- SIGMA ALDRICH). **PCR**. Le regioni ITS del rDNA nucleare sono state amplificate addizionando acqua e primers NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCG GAAGGATCATT-3') e NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCG CT-3') (10) ad un sistema pronto all'uso (Ready to go –Codisan). Il DNA di ciascun campione analizzato (2.5 µl) è stato amplificato in un volume finale di 25 µl. E' stato impostato il seguente ciclo termico: 10 min A 95°C, 35 cicli di 30 s a 95°C, 30 s a 58°C e 90 s a 72°C ed estensione finale a 72°C per 15 min (Termal Cycler 2720- Applied Biosystems). Un controllo negativo (no DNA) è stato incluso. 5 µl di ciascun amplificato è stato visualizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1% con etidio bromuro. **Restrizione enzimatica**. Sono stati utilizzati tre enzimi di restrizione (*Hha*I*, Hinf*I*, Taq*I),per l'identificazione di specie di *Anisakis*, previsti in bibliografia (3,9). I prodotti di digestione sono stati rivelati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%, aggiungendo un controllo positivo e il marker dei pesi molecolari (Ladder 100) (Amersham Pharmacia) e visualizzati tramite acquisitore d'immagine Chemi doc (Bio Rad). **Sequenziamento.** Le reazioni di sequenza sono state condotte con l'impiego del kit Applied Biosystems versione 3.1; i frammenti di PCR amplificati sono stati passati su colonnine G50 (GE), denaturati e analizzati per elettroforesi capillare su sequenziatore automatico Abi Prism 310 (AB). Le sequenze così ottenute, sono state analizzate mediante il software BLAST2 che le allinea con quelle più simili presenti in GenBank.

RISULTATI

Riguardo all'identificazione morfologica di genere sono state identificate, nell'ambito di tutte le larve di *Anisakis* esaminate, forme larvali L3 appartenenti sia al Tipo I che al Tipo II *sensu* Berland, in base alla presenza o meno del mucrone all'estremità caudale e alla forma del ventricolo (più corto nel Tipo II) (1).
L'applicazione della metodica PCR-RFLP, sulla base dei patterns delle bande di restrizione ottenute, lette mediante le chiavi esistenti in bibliografia (3,9), ha permesso di identificare la specie di tutte le larve esaminate estratte da 9 differenti specie di teleostei e da una specie di molluschi cefalopodi (*Todaropsis eblanae*).
In Tab 1 sono riportate le specie ittiche da cui sono stati isolati i nematodi anisakidi identificati come appartenenti al genere

Anisakis e la prevalenza delle specie di *Anisakis* identificate con PCR-RFLP.

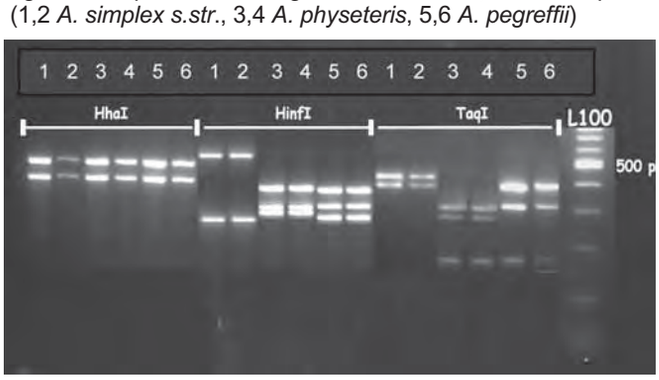
Tab 1 Prevalenza (%) delle specie di *Anisakis* identificate con PCR-RFLP

Specie esaminate	n.	n. larve esamin	*A. pegreffii*	*A. simplex s.str.*	*A. physeteris ris*
Lepidopus caudatus	11	22	100%(22)		
Trachurus trachurus	37	48	95.8%(46)		4.2% (2)
Trachurus mediterraneus	4	11	100%(11)		
Scomber scombrus	10	12	75% (9)	25% (3)	
Merluccius merluccius	11	18	83,3%(15)		16.7% (3)
Sardina pilchardus	2	4	100%(4)		
Zeus faber	1	4	100%(4)		
Phycis phycis	1	2			100%(2)
Molva	1	2	100%(2)		
Todaropsis eblanae	2	2			100%(2)
totale		125	90.4% (113)	2.4%(3)	7.2%(9)

Tutte le forme larvali identificate morfologicamente al microscopio ottico come *Anisakis* di Tipo I sono state identificate, mediante la PCR-RFLP, in base alla combinazione dei patterns RFLP, (Fig 1) come appartenenti alle specie *Anisakis pegreffii* e *Anisakis simplex sensu stricto,* mentre le larve di Tipo II sono risultate appartenere alla specie *Anisakis physeteris*: le prevalenze ottenute sono state rispettivamente del 92.8% (Tipo I) e del 7,2% (Tipo II).

L'amplificazione della regione di rDNA (comprendente ITS-1, 5.8S, ITS-2), ha prodotto un frammento di circa 1.000 bp. La digestione delle regioni ITS con *Hha*I produce lo stesso pattern per le tre specie identificate cioè 550 e 430 bp, mentre con *Hinf*I si evidenziano due bande di circa 620 e 250 bp più un frammento di circa 100 bp in *A. simplex sensu stricto*, tre bande di 370, 300 e 250 bp nella specie *Anisakis pegreffii,* e tre frammenti di 380, 290 e 270 bp per la specie *Anisakis physeteris*; la restrizione con *Taq*I evidenzia tre frammenti per *Anisakis pegreffii* (400,320 e 150 bp), per *A. simplex s.str*. (430,400 e 100 bp) e per *Anisakis physeteris* (300, 280 e 140 bp) (Fig 1).

Fig 1: RFLP pattern delle regioni ITS con *Hha*I, *Hinf*I e *Taq*I (1,2 *A. simplex s.str*., 3,4 *A. physeteris*, 5,6 *A. pegreffii*)



Le specie di *Anisakis* da noi identificate mediante analisi genetica PCR- RFLP, sono state confermate dai risultati del sequenziamento sui frammenti di PCR amplificato

CONCLUSIONI

Differenti studi hanno dimostrato che le regioni ITS (ITS1, 5.8 S e ITS2) dell' rDNA nucleare rappresentano utili marcatori genetici per l'accurata identificazione delle diverse specie e morfospecie di *Anisakis*., agenti eziologici dell'anisakiasi umana. Lo studio da noi condotto con l'applicazione di tale metodica biomolecolare ci ha permesso di avere dei dati sulla diffusione delle specie di *Anisakis* nei prodotti della pesca della nostra regione. In bibliografia diversi lavori riportano la diffusione di *Anisakis* nel Mar Mediterraneo la cui specie a maggior prevalenza risulta essere *Anisakis pegreffii* (4,5), specie gemella appartenente alla morfospecie *Anisakis simplex*, termine con cui questo nematode dei pesci è notoriamente conosciuto. Le prevalenze delle altre specie da noi identificate si avvicinano a quelle osservate da altri autori nei pesci del Mar Mediterraneo (4) come anche la preferenza per l'ospite: per es. la specie *Anisakis physeteris* viene spesso osservata nelle specie ittiche demersali es *Merluccius merluccius* (5) mentre la specie *Anisakis simplex sensu stricto* è stata osservata in *Scomber scombrus* in diverse zone delle coste tunisine(4). Alcuni studi recenti a questo proposito suggeriscono l'uso dei nematodi anisakidi del genere *Anisakis* come "biological tags" (5). E' stata inoltre avanzata l'ipotesi che i molluschi cefalopodi rappresentino degli ospiti intermedi per la specie *Anisakis physeteris* (5). Tale specie è stata da noi ritrovata in campioni di cefalopodi e teleostei pescati nel messinese (Mar ionio).

L'applicazione di metodi molecolari, come la PCR-RFLP, permette una corretta identificazione delle specie di Anisakidae, fornendo anche un contributo significativo a studi epidemiologici sulla diffusione di entità tassonomiche esistenti.

BIBLIOGRAFIA

1) Berland B. (1961) Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sarsia 2:1-50
2) Costa A., Sciortino S., Reale S., Alio V., Cusimano M., Caracappa S.(2008) Indagine sulla presenza di nematodi Anisakidae in specie ittiche marine Atti X Congr Naz S.I.Di.L.V. ; 30-31
3) D'Amelio S., Mathiopoulos K.D., Santos C.P., Pugachev O.N., Webb S.C., Picanço M., Paggi L.(2000) Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. Int J Parasitol 30: 223-226
4) Farjallah S., Slimane B.B.,Busi M., Paggi L., Amor N., Blel H., Said K.,D'Amelio S. (2008) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp from the North African coasts of Mediterranean Sea Parasitol Res 102(3); 371-9
5) Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G. (2004) Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition J Fish Biology 65; 495-510
6) Moschella C.M., Mattiucci S., Mingazzini P., De Angelis G., Assenza M., Lombardo F., Paggi, L.,Modini C. (2004) Intestinal anisakiasis in Italy :case report J. Helminthol 78(3);271-3
7) Paggi L., Mattiucci S., D'Amelio S.(2001)Allozyme and PCR-RFLP markers in anisakid nematodes, aethiological agents of human anisakidosis Parassitologia 43 (Suppl1);:21-27
8) Paggi L., Mattiucci S., D'Amelio S., Nascetti G. (1998). Nematodi del genere *Anisakis* in pesci, cefalopodi e cetacei del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico e Pacifico. Biologia Marina Mediterranea, 5(3): 1585-1592.
9) Pontes T., D'Amelio S., Costa G., Paggi L. (2005) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species J Parasitol 91;1430-4
10) Zhu X., Gasser R.B., Podolska M., Chilton N.B. (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences, Int J Parasitol 28: 1911-1921

"Ricerca Corrente IZS SI 11/07 Ministero della Salute"

Si ringrazia Antonina Zimmardi per la collaborazione tecnica

POPOLAZIONE DI *M. BOVIS* NELL' ITALIA NORD-OCCIDENTALE: TRENDS DEGLI SPOLIGOTIPI NEGLI ISOLAMENTI EFFETTUATI NELL'ULTIMO DECENNIO (1998-2008)

Vitale N.[2], Garrone A.[1], Fulghesu L.[1], Goria M.[1], Zoppi S.[1], Rossi F.[1], Dondo A.[1], Bergagna S.[1], Chiavacci L.[2]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta*

[2] *Osservatorio Epidemiologico Regionale del Piemonte*

Key words: TBC, trend, spoligotipo

SUMMARY

Following molecular characterization of over than 1500 *M. bovis* strains collected during the last decade trough the tb eradication procedure (*post mortem* confirmation tests) in Piedmont, we analyzed the spoligotype diversity of this *M. bovis* population.

The aim of this work was to assess significant correlation between the reduction of tb prevalence constantly registered in the same period and the diversity of spoligotype of *M. bovis* strains from outbreaks yearly occurred.

INTRODUZIONE

Il piano di controllo nazionale per la Tubercolosi bovina (TB) ha avuto inizio in Italia nel 1977; tuttavia in Piemonte si può parlare di piano di eradicazione solo a partire dal 1983. Negli anni 80 l'infezione era assai diffusa sul territorio regionale e la prevalenza per allevamento si attestava attorno al 17%. L'introduzione di controlli mirati *in vita* e *post mortem* ha portato negli anni ad una diminuzione costante dell'infezione che, tuttavia, sembrava arrestarsi intorno alla fine degli anni '90.

La qualifica comunitaria di territorio ufficialmente indenne per bTB appariva un obiettivo assai lontano nel 2001, considerando che la prevalenza media era del 1,3%. Per accelerare il processo di eradicazione, nel 2001 fu varato un "Piano straordinario" che sfruttava le tecniche innovative in campo diagnostico introducendo accanto alla tubercolina il gamma interferon come test in vita per aumentare la sensibilità delle prove diagnostiche e la tipizzazione molecolare sugli isolamenti di micobatteri (DVR spoligotipi e VNTR-ETR).

Il protocollo, che divenne operativo nel 2002, è tuttora in vigore, e ha portato la prevalenza dell'infezione allo 0.22%. Per esaminare la progressione del piano e per valutare se la riduzione della prevalenza di bTB fosse accompagnata da una riduzione nella diversità dei ceppi di *M. bovis,* sono stati analizzati i dati di tipizzazione molecolare effettuati negli ultimi 10 anni dall'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

MATERIALI E METODI

I dati analizzati sono stati raccolti nell'ambito del progetto di ricerca corrente anno 2006: "Patologie da Micobatteri: approccio integrato tra metodi diagnostici (*in vita* e *post mortem*) e correlazioni di ordine epidemiologico", finanziato dal Ministero della Salute (3).

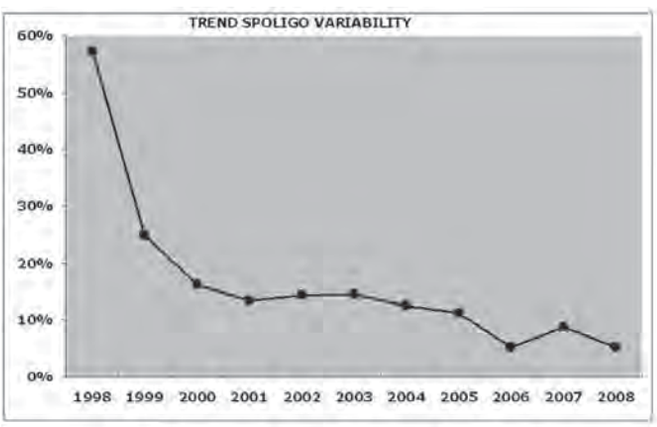
Sono stati esaminati su base genotipica i ceppi di *M. bovis* isolati presso il laboratorio di Patologia Animale su 1572 capi bovini provenienti da 469 allevamenti nel corso del decennio 1998-2008.

L'attività di isolamento è diventata di routine a partire dal 2002, per cui Il materiale isolato precedentemente è stato tipizzato nel corso del 2008. Il laboratorio di Biotecnologie ha eseguito tutte le caratterizzazioni molecolari utilizzando la tecnica dello Spoligotyping. Il target genetico alla base del metodo, descritto da J. Kamerbeek *et al*., (5), è il locus DR, regione cromosomica contenente sequenze conservate e ripetute (Direct Repeat) di 36 bp, intervallate da sequenze non ripetute (spacer).

I dati raccolti contenenti i profili di spoligotipi sono stati analizzati dall'Osservatorio Epidemiologico con il software Sas®. Per confrontare la variabilità prima e dopo l'introduzione del protocollo sperimentale è stato eseguito un test di trend (Cochran-Armitage), utilizzando come cut-off il 2002 e considerando 4 classi di variabilità.

La variabilità degli spoligotipi è stata calcolata come percentuale degli spoligo sugli isolamenti. Successivamente per valutare la direzione del trend individuato, è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman (1).

Figura 1 *trend della variabilità degli spoligotipi*



RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale sono stati osservati 64 differenti spoligotipi. I due spoligo più frequenti di tipo BCG sono stati: SB0120 e SB0134, che rappresentano rispettivamente il 67.23% e il 9% degli spoligo tipizzati. Nel 1998 come nel 2008 lo spoligo predominante è stato SB0120. Questo risultato era largamente atteso, giacché altri lavori hanno segnalato la sua diffusione in Italia e in Francia (2,4).

Anno	Focolaio TB	Focolai con isolamenti	ceppi	Spoligotipi
1998	276	6	7	4
1999	182	20	24	6
2000	97	36	68	11
2001	281	29	75	10
2002	207	59	126	18
2003	96	60	130	19
2004	71	33	120	15
2005	54	39	117	13
2006	33	32	228	12
2007	34	29	184	16
2008	26	26	113	6

Tabella 1: *numero di focolai TB, isolamenti, ceppi e spoligotipo negli anni*

La variabilità dei ceppi ha subito negli anni una drastica riduzione: mentre nel 2003 erano stati individuati ben 19 ceppi diversi nel 2008 i ceppi dissimili sono stati 6 e questo a fronte di un numero di isolamenti sovrapponibile. Nel 2008 dei 113 ceppi isolati 102 erano di tipo SB0120. Questa riduzione è risultata statisticamente significativa; infatti il test CA supporta l'ipotesi di trend ($Z=6.03$, $p>0.0001$). Il coefficiente di correlazione di Spearman (-0.54; IC:-0.64,-0.44) mostra evidenza di associazione negativa tra anni e variabilità degli spoligo.
Sebbene gli isolamenti prima del 2002, non costituissero lavoro di routine, i dati mostrano comunque, nel tempo, una riduzione di variabilità a fronte di un aumento di attività.
Questo fenomeno, accanto alla riduzione della prevalenza dell'infezione e all'aumento del numero di province ufficialmente indenni, può essere letto come un indicatore di risultato delle strategie di controllo adottate nella regione.

BIBLIOGRAFIA

1. Agresti, A. (2002) Categorical Data Analysis. New York: John Wiley and Sons
2. Boniotti MB, Goria M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. (2009) J Clin Microbiol. 47(3):636-44.
3. Dondo A., Vitale N., Fulghesu L., Rossi F., Cazzaniga G., Carlino F., Petruccelli G., Mascarino D., Gennero M.S., Bozzetta E., Goria M., Chiavacci L. (2009). Relazione finale progetto di ricerca corrente "Patologie da Micobatteri: approccio integrato tra metodi diagnostici (in vita e post mortem) e correlazioni di ordine epidemiologico".
4. Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000 (2001) J Clin Microbiol.;39(10):3623-32.
5. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S.Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35:907–914.

IDENTIFICAZIONE IMMUNOFENOTIPICA DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE NEL SANGUE E NEL LATTE DI PECORA

Bonelli P., Re R., Pilo G.A., Colorito P., Fresi S., Pais L., Nicolussi P.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari;

Keywords: sottopopolazioni linfocitarie, sangue, latte, pecora.

ABSTRACT
This work aimed to evaluate lymphocyte subsets of sheep blood and milk. Using flow cytometry, we determined percentages of T cells (CD4+, CD8+, γδ) from milk and blood of adult lactating ewes (n=120). Significantly higher percentages of CD8+ and WC1+ and lower percentages of CD4+ cells were found in milk than in blood. We conclude that proportions of T cells subsets differ significantly between blood and milk. Further studies are needed to better understand lymphocytes functions and trafficking in ewe mammary gland.

INTRODUZIONE
L'immunologia della ghiandola mammaria rappresenta un campo interessante su cui, ultimamente, la ricerca veterinaria sta focalizzando la propria attenzione. In particolare, per quanto riguarda la specie ovina, la letteratura scientifica sull'argomento necessiterebbe un ampliamento verso nuove esperienze specifiche. Indubbiamente, l'acquisizione di nuove informazioni relative alle sottopopolazioni linfocitarie del sangue e del latte di pecora e una loro migliore interpretazione per mezzo di adeguati intervalli di riferimento, rappresentano un presupposto indispensabile per la comprensione dei meccanismi di difesa immunitaria a livello sistemico e mammario. L'identificazione delle sottopopolazioni linfocitarie in citometria a flusso è resa possibile dall'individuazione contemporanea delle caratteristiche morfologiche ed antigeniche dei tipi cellulari in esame. Infatti, insieme con le caratteristiche morfologiche evidenziabili con l'analisi del segnale di luce diffusa frontale (Forward Scatter, FCS) e laterale (Side Scatter, SSC), vengono utilizzati markers immunologici espressione delle diverse classi linfocitarie (CD45, CD4, CD8, WC1).
Tra questi il CD45 è tra i più importanti in quanto consente, insieme con il SSC, la definizione di un area precisa appartenente ai linfociti e la conseguente costituzione di un cosiddetto "*gate immunologico*", fondamentale per un'adeguata analisi citometrica. Il CD45, definito anche Leukocytes Common Antigen (LCA), è una glicoproteina integrale di membrana ad attività tirosin-fosfatasica e coinvolta nell'attivazione dei linfociti T, espressa su tutte le cellule della serie bianca, in particolare modo linfociti e monociti (1). A differenza dell'uomo e di altre specie animali, per la pecora non è stato ancora riconosciuto un antigene di superficie cellulare analogo del CD3 utile per l'evidenziazione dei soli linfociti T. Si ricorre, pertanto, all'identificazione diretta dei principali subsets T individuati dagli antigeni CD4, CD8 e WC1, quest'ultimo particolarmente espresso sui linfociti dei ruminanti (2).
I linfociti T che esprimono la proteina trasmembrana CD4 vengono chiamati linfociti T helper per la loro attività regolatoria che si esplica prevalentemente nell'induzione dei linfociti B alla produzione anticorpale, dei linfociti citotossici alla differenziazione e dei macrofagi alla attivazione (3). L'antigene CD8, invece, costituisce una glicoproteina transmembrana che identifica i linfociti T ad attività citotossica e regolatoria. L'attività citotossica si esprime nella neutralizzazione di fenotipi cellulari *self* e *non self*, mentre l'attività regolatoria consiste nella soppressione, di un'eccessiva produzione anticorpale da parte dei linfociti B (4). Infine, la proteina denominata WC1 è un antigene di membrana espresso sulla superficie dei linfociti T γδ CD4-CD8- (5), le cui funzioni non sono ancora pienamente conosciute, si ipotizza tuttavia che partecipino ai meccanismi di difesa dell'organismo per mezzo di attività di tipo citotossico (6).
Lo scopo del presente lavoro è stato quello di identificare in citometria a flusso le sottopopolazioni linfocitarie T del sangue e del latte ovino attraverso l'espressione degli antigeni di membrana CD45, CD4, CD8 e WC1 nonché di calcolarne degli appropriati intervalli di riferimento.

MATERIALI E METODI
Campionamento
Sono stati prelevati campioni di sangue e di latte ovino da 120 pecore adulte di razza sarda e in ottime condizione di salute nella loro prima metà di lattazione. I campioni pervenivano in laboratorio entro le 3-4 ore dal prelievo al fine di limitare la mortalità cellulare.
Allestimento delle prove
E' stato allestito un protocollo di marcatura a quattro colori (WC1/CD8/CD45/CD4) su ciascun campione di sangue e di latte impiegando gli anticorpi monoclonali specifici per la specie ovina riportati nella tabella sottostante.

Antigene	Fluorocromo	Ditta
WC1 (clone 19.19)	FITC	SEROTEC
WC1 (clone CC15)	FITC	SEROTEC
CD8	RPE	SEROTEC
CD45	Biotinilato	SEROTEC
CD4	Alexa Fluor 647	SEROTEC

Reagente secondario	Fluorocromo	Ditta
Streptavidina	RPE-Cy5	SEROTEC

Per quanto riguarda il WC1 si sono impiegati i due differenti anticorpi monoclonali coniugati con lo stesso fluorocromo in modo da identificare le cellule T γδ riconosciute dai diversi cloni.
L'identificazione delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue è stata effettuata mediante una metodica "*lyse and wash"*. L'isolamento delle cellule somatiche del latte avveniva previa eliminazione del grasso affiorato in seguito a centrifugazione (500g per 20 minuti a 10 °C) e raccolta della componente cellulare presente nel pellet. Si eseguivano ripetuti lavaggi in PBS (300g per 6 minuti a 16 °C) e la conta con un emocitometro manuale al fine di ottenere una sospensione cellulare idonea (circa $10x10^6$ cellule/ml) per l'esecuzione delle marcature e l'acquisizione in citometria a flusso.
Marcature e citometria a flusso
Il campione veniva depositato in un tubo da citometria (12x75 mm, Falcon, BD) in quantità di 50 µl di sangue intero e 100 µL di sospensione cellulare ottenuta dal latte. L'evidenziazione del solo CD45 avveniva tramite una marcatura indiretta eseguita all'inizio del procedimento. Si procedeva con l'impiego di una *mix solution* costituita dagli anticorpi monoclonali anti-sheep WC1/CD4/CD8. In seguito ad una incubazione al buio a 4°C per 20 minuti e agli opportuni lavaggi si procedeva all'acquisizione al citometro a flusso (FACS Calibur. BD). L'analisi dei dati è stata eseguita tramite il software Cell Quest Pro (BD).
Analisi statistica e calcolo degli intervalli di riferimento
L'analisi della varianza (one-way ANOVA) è stata effettuata per mettere in evidenza eventuali differenze significative riscontrabili nelle medie percentuali delle sottopopolazioni linfocitarie del sangue e del latte.

Il test di Anderson-Darling è stato eseguito al fine di verificare la normalità delle distribuzioni dei dati relativi ai vari parametri analizzati per una corretta costruzione degli intervalli di riferimento.(Minitab, Minitab inc.). Gli intervalli di riferimento dei diversi datasets sono stati calcolati secondo le raccomandazioni dell'IFCC (7), ed in base al tipo di distribuzione dei dati si sono impiegati metodi statistici parametrici secondo la formula:
media ± 1,96 ds; ds: deviazione standard;
ovvero metodi statistici non parametrici, nello specifico il calcolo del 2,75° percentile e del 97,5° percentile.

RISULTATI

L'analisi fenotipica delle diverse sottopopolazioni linfocitarie mostra differenze significative tra il comparto sanguigno e quello mammario (Fig. 1 e 2). La presenza di linfociti CD4+ nel sangue (25,5±15,9%) è risultata superiore (P≤0,01) a quella del latte (11,3±6,9%) mentre le percentuali dei linfociti CD8+ del sangue (20,3±6,6%) sono inferiori (P≤0,01) in rapporto al latte (66,3±16,5%). Di conseguenza il rapporto CD4/CD8 pari a 1,4±0,6 nel sangue diminuiva significativamente (P≤0,01) nel latte sino a raggiungere il valore di 0,2±0,1. Infine, i linfociti WC1+, subset della popolazione T a recettore γδ, osservati nel sangue (10,2±3,6%) sono meno numerosi (P≤0,01) di quelli osservati nel latte (26,3±14,6%). In tabella 1 si riportano gli intervalli di riferimento calcolati per il sangue e per il latte.

DISCUSSIONE

Da quanto emerge dal presente lavoro le sottopopolazioni linfocitarie del sangue di pecora appaiono profondamente differenti da quelle riscontrate nel latte. In accordo con quanto riportato da altri autori (8), infatti, si nota come i linfociti CD4+ siano maggiormente rappresentati nel sangue rispetto al latte mentre i linfociti CD8+ lo siano in misura inferiore, determinando in tal modo un inversione del rapporto CD4/CD8. A differenza di quanto osservato nel bovino da Van Kampen et al. l'espressione del WC1 da noi rilevata nella pecora appare maggiore nel latte rispetto al sangue. Gli autori riportavano come nel latte bovino le percentuali di linfociti T γδ WC1+ aumentavano esclusivamentenel periodo del parto a causa di un presumibile aumento del passaggio di tali cellule dal sangue nel comparto mammario, come testimoniato da una maggiore espressione della molecola di adesione L-selectina sulla superficie cellulare degli stessi linfociti (9).
Gli intervalli di riferimento riportati sono stati calcolati secondo le raccomandazioni dell'*International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), secondo le quali il metodo statistico impiegato viene scelto in base alla distribuzione dei dati. Infatti, se i datasets si distribuiscono in maniera normale la costruzione degli intervalli di riferimento si riferirà alla media e alla sua deviazione standard, al contrario se la distribuzione non può essere considerata normale si privilegiano metodi statistici non parametrici come il calcolo dei percentili. I valori di riferimento permettono di confrontare i dati ottenuti in un animale con dati derivati da una popolazione di riferimento, che nel nostro caso era pari a 120 individui apparentemente sani come da raccomandazioni dell'IFCC. La disponibilità di intervalli di riferimento adeguatamente preparati consente una corretta interpretazione del dato di laboratorio garantendo l'attribuzione di un preciso significato dei valori osservati nel processo clinico di *decision-making*.
I risultati di questo lavoro sono un presupposto indispensabile per meglio comprendere il ruolo dell'immunità cellulo-mediata nella difesa della mammella ovina contro gli agenti infettivi responsabili di mastite. Ulteriori approfondimenti si ritengono comunque necessari per meglio definire i meccanismi di trafficking cellulare dal comparto sanguigno a quello mammario nonchè l'attività funzionale dei tipi cellulari maggiormente rappresentati nella mammella e responsabili dei meccanismi di immunità locale.

	sangue (%)		**latte** (%)	
	inter. rif.	media	inter. rif.	media
CD4	9,5–35	25,5	3,4–25,4	11,3
CD8	11–33,6	20,3	29,6–88	66,3
CD4/CD8	0,4–2,5	1,4	0,04–0,7	0,2
WC1	4,9–17,3	10,2	10,9–46,8	26,3

Tab.1: Intervalli di riferimento relativi all'espressione degli antigeni di superficie cellulare CD4, CD8, CD4/CD8 e WC1 nel sangue e latte di pecora.

Fig.1: Confronto tra le percentuali medie ± errore standard dei linfociti CD4+, CD8+ e WC1+ nel sangue e nel latte (P≤0.01).*

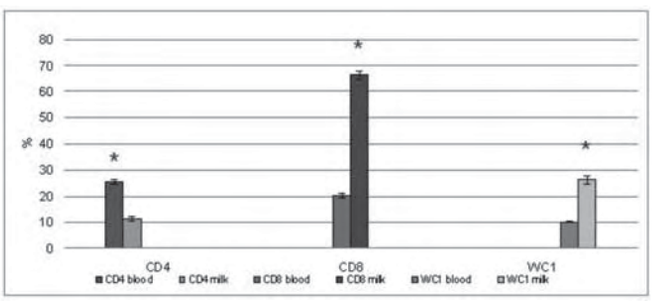
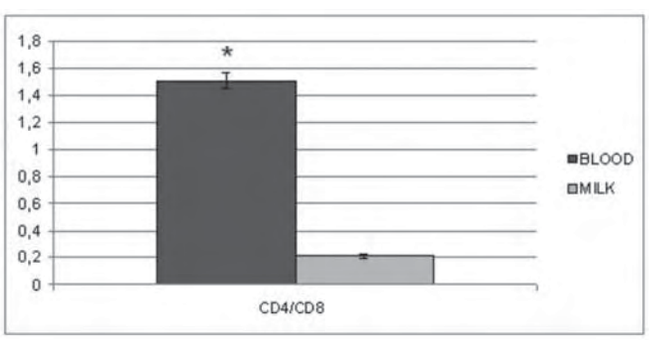


Fig.2: Confronto tra le medie ± errore standard dei rapporti CD4/CD8 nel sangue e nel latte (P≤0.01).*



BIBLIOGRAFIA

1) Haynes BF. *Summary of T cell studies performed during the second international workshop and conference on human leukocytes differentiation antigens.* in Leucocyte typing II,Human T lymphocytes.. Reinherz, EL et al.; 1986; pag. 3-30. Eds, Springerverlag,
2) Hein WR, Dudler L., Beya MF, Mackay CR. *Epitopes of the T19 lymphocyte surface antigen are extensively conserved in ruminants* Veterinary Immunology and Immunopathology 1991; 27(1):173-181.
3) Gaubin M, Autiero M, Houlgatter R, Basmaciogullari P, Auffray C, Piatier-Tonneau D. *Molecular basis of T lymphocyte CD4 antigen functions*. Eur J Clin Chem Clin Biochem; 1996; 34: 723.
4) Machug ND and Sopp P. *Bovine CD8 (BoCD8*). Vet Immunol Immunopathhol; 1991; 27: 65-69.
5) Morrison WI and Davis WC. *Differentiation antigens expressed predominantly on CD4- CD8-T lymphocytes (WC1 WC2).* Veterinary Immunology and Immunopathology 1991; 27: 71-76.
6) Lund BT, Evans CW, Davis WC, Mcconnell I, Bujdoso R. *Expression of T19 (WC1) molecules by ovine lymphocytes.* Vet Immunol Immunopathhol.1993; 39:145-153.
7) Solberg HE. *The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2004; 42: 710–714.
8) Persson-Waller K, Colditz IG. *Expression of surface antigens on blood and mammary leukocytes in lactating and dry ewes*. Vet Immunol Immunopathhol. 1998; 68: 273-278
9) Van Kampen C, Mallard BA, Wilkie BN. *Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows.* Vet Immunol Immunopathhol. 1999; 69: 23-32.

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA CELLULARE DI TOPI INFETTATI SPERIMENTALMENTE CON *M. BOVIS BCG*

Curina G.[1], Paternesi B.[1], Cagiola M.[1], Montagnoli C. [3], De Giuseppe A. [1], Forti K. [1], Mazzone P. [1], Marcaccio S. [1]; Pasquali P. [2]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

[2]Istituto Superiore di Sanità

[3]Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche – Sezione di Anatomia Umana

Keywords: *Mycobacterium bovis BCG*, Flow Cytometric, T-Cell

SUMMARY

Bovine tuberculosis is considered a disease of socio-ecomonic and public health importance and of high significance for the international trade of animals and their products. Understanding the dynamic of the immune response is crucial to elaborate new strategic control measures to reduce the spreading of the disease. For this reason the aim of our study is to analyze, in CD1 mouse model, the interaction between the *Mycobacterium bovis* BGC and the immune competent cells.

The data obtained in this preliminary study showed that in CD1 mice infection due to M.bovis induces mainly a cell-mediated immune response, suggesting that CD1 mice can serve as good model to the study of the interaction between hosts and pathogens.

INTRODUZIONE

Nonostante i numerosi studi effettuati sia in ambito veterinario che umano, la tubercolosi (TB) continua ad essere la principale causa di morbilità in numerose specie animali e di mortalità nell'uomo. Le conoscenze relative alla patogenesi e alla risposta immunitaria indotta nell'organismo ospite dai principali micobatteri patogeni (*M. bovis* e *M. tuberculosis*) sono state acquisite impiegando modelli animali (5,6). E' stato evidenziato che la risposta immunitaria contro le infezioni da micobatteri è mediata dall'interazione tra le cellule Th1 sensibilizzate ed i macrofagi attivati (APC) che producono numerose citochine (4), tra cui gioca un ruolo determinante il gamma-interferon (IFN-γ). Il *Mycobacterium bovis BCG* è stato in passato impiegato per le sue proprietà immunostimolatorie nell'allestimento di un vaccino (2) contro l'infezione da micobatteri con notevoli risultati pratici. Scopo della nostra indagine è approfondire le conoscenze in merito alla interazione tra tale micobatterio e alcune cellule immunocompetenti quali linfociti T, linfociti B, Natural Killer (NK) e Macrofagi in topi CD1.

MATERIALI E METODI

Animali e modello sperimentale

Sono stati utilizzati 40 topi CD1 (20-30gr), suddivisi in 4 gruppi ciascuno composto da 5 animali di controllo e 5 animali infettati per via endovenosa con 0.5 mg ($4*10^6$ (U.F.C) di una patina umida di *M. bovis BCG* (ATCC 27291), fatta crescere per 30g. in terreno Dorset-Henley modificato. Gli animali oggetto di studio sono stati abbattuti a 7, 14, 30 e 60 giorni dopo l'inoculazione sperimentale (DPI) con il micobatterio.

Preparazione campioni per analisi citofluorimetrica

Le diverse popolazioni cellulari ottenute da ogni campione di milza, sono state poste ad incubare a temperatura ambiente (20°C), alla concentrazione di $1*10^6$ cellule con anticorpi monoclonali primari PE anti-mouse F4/80-Pan Macrophage marker (eBioscience), PE anti-mouse N.K. 1.1 (eBioscience), FITC anti-mouse CD3e (eBioscience), PE-Cy5 anti- mouse CD4 (eBioscience), PE-Cy5 anti- mouse CD8 (eBioscience), PE anti-mouse/human CD45R (eBioscience).

Analisi in citometria a flusso

I campioni allestiti sono stati processati usando lo strumento FACSCalibur(BD), equipaggiato con un laser BLUE 488 nm.

Il settaggio dello strumento è stato ottimizzato utilizzando le CALIBRITErmTM 3 (BD Biosciences). I dati fluorimetrici sono stati analizzati utilizzando il software CellQuest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

RISULTATI

I dati ottenuti dallo studio fenotipico delle popolazioni cellulari coinvolte nel processo infettivo, hanno evidenziato un netto aumento, nel tempo, dei linfociti T CD3(+) che raggiungono la massima entità a 60 DPI (fig.1).

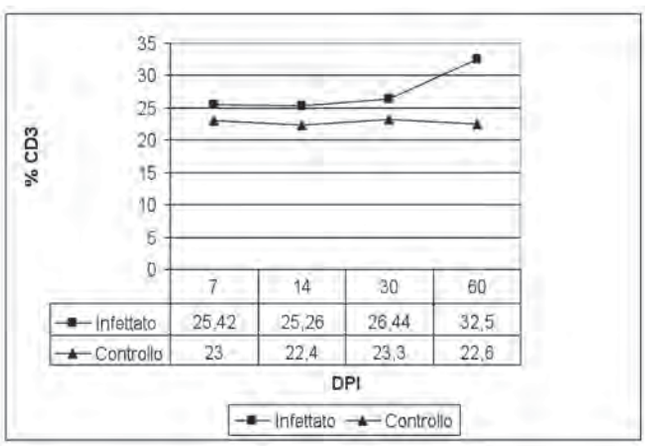


Fig1: Variazione nel tempo della popolazione Linfocitaria CD3(+)

Per ciò che concerne le altre popolazioni non sono state rilevate significative variazioni di percentuale durante il periodo di osservazione (dati non mostrati). Per valutare il coinvolgimento delle cellule immunocompetenti, è stata inoltre valutata l'intensità del segnale espressa dalle diverse cellule. Come mostrato nelle fig.2-3-4, è stato notato un sostanziale aumento sia delle cellule immunitarie aspecifiche come i macrofagi e le Natural killer (fig.2 e fig.3) , sia delle cellule immunitarie specifiche come i linfociti CD4(+) e CD8(+) (fig.4a e fig.4b).

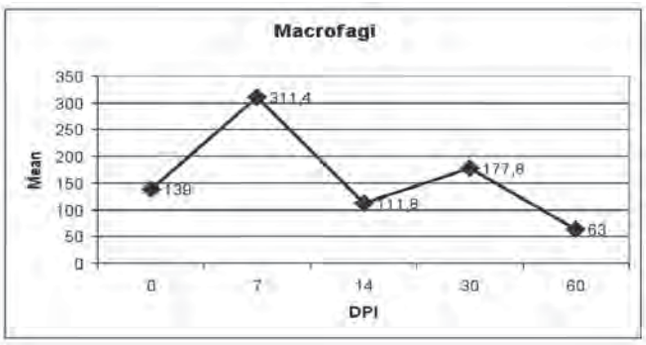


Fig2: cinetica dei macrofagi (f4/80)

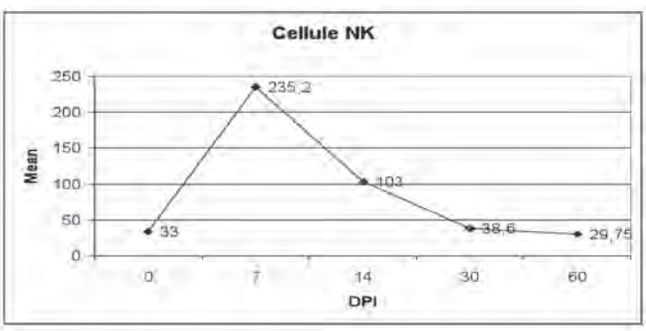


Fig3: cinetica delle NK

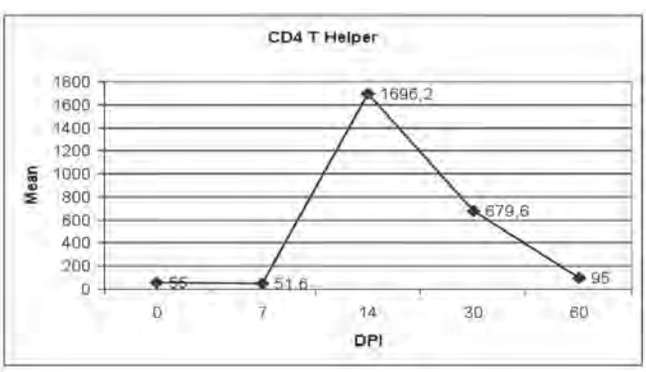


Fig. 4a:cinetica dei CD4(+)

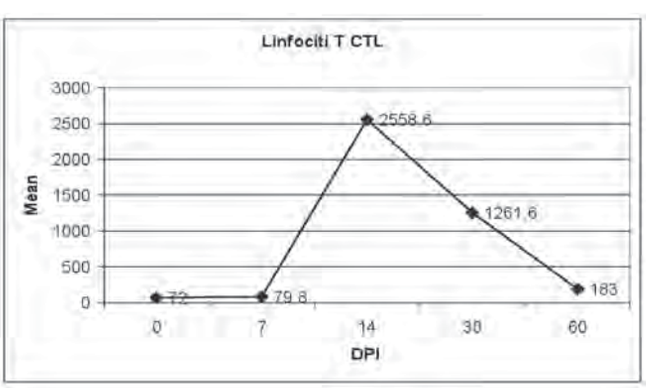


Fig 4b:cinetica dei CD8(+)

Infine, è stato riscontrato un incremento esponenziale dei linfociti B dal 7 DPI in rappresentanza del coinvolgimento della risposta immunitaria umorale al processo infettivo (fig.5).

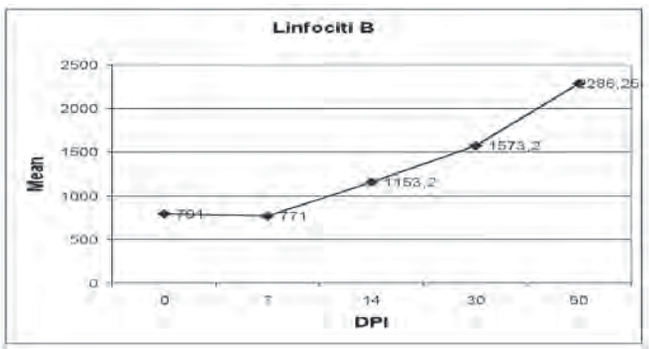


Fig 5:cinetica della risposta umorale

DISCUSSIONE

I dati ottenuti dal modello sperimentale hanno confermato che tutte le cellule immunocompetenti sono coinvolte nella risposta all'infezione da parte del ceppo batterico *M.bovis* BCG.

Relativamente ai macrofagi, è stato riscontrato un loro interessamento a 7 DPI, confermando il ruolo chiave che essi svolgono nel controllo e nella distruzione del patogeno.

I risultati ottenuti riguardo le cellule NK confermano il loro coinvolgimento nell'immunità innata aumentando nelle prime fasi dell'infezione, probabilmente come fonte primaria di IFN-γ precoce.

La cinetica delle popolazioni linfocitarie presa in considerazione, viene avvalorata dai dati riportati in letteratura (1). Nelle forme meno avanzate dell'infezione notiamo infatti la presenza delle cellule CD4(+) e CD8(+) a 14 DPI. La prima subpopolazione CD4(+) assume un ruolo chiave nella produzione del IFN-γ. La seconda subpopolazione CD8(+) assume importanza nell'eliminare cellule che ospitano al loro interno i micobatteri (3).

Dal 7 DPI si assiste, infine, ad un aumento esponenziale della popolazione dei linfociti B CD45R(+), confermando i risultati di altri autori (1), i quali hanno dimostrato che la risposta umorale tende a predominare nelle fase tardive della patologia.

Questo studio è stato utile per approfondire le conoscenze sull'infezione indotta da *M. bovis* BCG in topi CD1 e può servire come presupposto per sviluppare nuove strategie di controllo della tubercolosi.

BIBLIOGRAFIA

1. J.M. Pollock and S.D. Neil "Mycobacterium bovis Infection and Tuberculosis in cattle" The veterinary journal 2002 115-127
2. JoAnne L. Flinn; "Immunology of Tuberculosis and implication in vaccine development" Tuberculosis 2004 93-101
3. D. Sud; C.Bigbee; J.L. Flynn and D.E. Kirschner "Contribution of CD8+ T cell to control of Mycobacterium tuberculosis infection" 2006 The journal of Immunology 4296-4314
4. F., Biet., L. kremer., I. Wolowczuk., M. Delacrem and C. Locht "Mycobacterium bovis BCG producing interleukin-18 increases antigen- specific gamma interferon production in mice" 2002 Infection and Immunity 6549-6557
5. K.Huygen., D. Abramowicz., P.Vandenbussche., F.Jabobs., J. De Bruyn., A. Kentos., A. Drowart., J.P. Van Vooren and M. Goldman " Spleen cell cytokine secretion in Mycobacterium bovis BCG – infected mice" 1992 Infection and immunity
6. K.Huygen., K. Palfliet.,F. Jurion., C. Lenoir and J.P. Van Vooren "Antibody repertoire against culture filtrate antigemns in wild house mice infected with Mycobacterium bovis BCG" 1990 Clin. exp.Immunol. 369-372.

IMPIEGO DEGLI ANTIGENI RICOMBINANTI ESAT 6/CFP 10 NEL GAMMA-INTERFERON TEST IN BOVINI INFETTI DA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: DATI PRELIMINARI

Mazzone P.[1], Nardini R.[3], Agnetti F.[1], Biagetti M.[1], Boniotti B.[2], Cagiola M.[1], Caporali A.[1], Ciullo M.[1], Ferrante G.[1], Gradi M.[1], Mangili PM.[1], Pacciarini ML.[2], Papa P.[1], Rosignoli L.[4], Maresca C.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche
[2]Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi bovina da M. bovis
[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana
[4]Medico Veterinario Libero Professionista

Parole chiave: tubercolosi bovina, γ-IFN test, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

SUMMARY

Immunological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle is often confounded by cross-reactive responses resulting from exposure to other mycobacterial species, especially *Mycobacterium avium*. Early secretory antigenic target 6 (ESAT-6) and culture filtrate protein 10 (CFP-10) are dominant gamma interferon (IFN-gamma)-inducing antigens of tuberculous mycobacteria, and they are absent from many environmental nontuberculous mycobacteria. Since *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) exposure is the primary confounding factor in the diagnosis of *M.bovis*-infected animals, in vitro IFN-gamma responses to a recombinant ESAT-6/CFP-10 (rESAT-6/CFP-10) fusion protein by blood leukocytes from cattle naturally exposed to MAP were investigated. Responses to heterogeneous mycobacterial antigens (i.e., purified protein derivatives [PPDs] were also evaluated. In this preliminary study, it appears that use of the rESAT-6/CFP-10 fusion protein could be useful for the detection of Bovine tuberculosis in herds with pre-existing sensitization to *M. avium* subsp. *paratuberculosis.*

INTRODUZIONE

La diagnosi della Tubercolosi Bovina (TB) in molti Paesi Europei da diversi anni viene effettuata utilizzando, in associazione alla prova intradermica (IDT), il test del γ-interferon (γ-IFN). Tale metodica rileva la quantità di citochina prodotta dai linfociti T degli animali infetti, in risposta ad una stimolazione effettuata con l'antigene tubercolare (PPD) (1). Tuttavia la valutazione immunologia per individuare animali infetti da *Mycobacterium bovis*, risulta spesso complicata da reazioni crociate che si osservano negli animali esposti ad altre specie di Micobatteri, in particolare *Mycobacterium avium* subsp. *avium* e *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Gli antigeni normalmente impiegati nella fase stimolatoria dei linfociti nel γ-IFN test, sono le tradizionali tubercoline (PPDs) Bovina ed Aviare, costituite da un complesso antigenico proteico, strutturale e secretorio, scarsamente purificato.

Le *performances* diagnostiche del γ-IFN test eseguito utilizzando le PPDs tradizionali, sono state valutate in diversi studi svolti in Australia, Europa e USA (2); in questi *trials* la sensibilità e la specificità mediane del γ-IFN sono risultate rispettivamente del 87,6% e del 96,6%. L'uso di un test immunologico con questi valori di accuratezza in territori dove la prevalenza di TB a livello individuale è bassa, porterebbe a macellare un numero inaccettabile di bovini non infetti (2); per questo motivo nel mondo scientifico si sono moltiplicati gli studi condotti per aumentare i valori di specificità del γ-IFN test. Gli antigeni ESAT6 e CFP10, non essendo presenti nella maggior parte dei micobatteri ambientali e neanche nel ceppo vaccinale *M.bovis* BCG, quando impiegati nel γ-IFN test si sono rivelati efficaci nell'incrementarne la specificità, riducendo notevolmente le false positività legate all'impiego delle tubercoline tradizionali (3, 4).

Nella nostra indagine, abbiamo voluto verificare se l'impiego di un mix di rESAT6/CFP10 nella fase di stimolazione linfocitaria del test γ-IFN, sia efficace nell'evitare la rilevazione di false positività alla TB in soggetti indenni da TB ma infetti da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati due allevamenti risultati indenni da Tubercolosi Bovina negli ultimi 6 anni. In un allevamento, ad indirizzo produttivo carne con 173 bovine in produzione, nell'ultimo anno sono stati riscontrati casi clinici di Paratubercolosi (PTBC), confermati dalle indagini sierologiche e dagli accertamenti *post-mortem*. L'altro allevamento, costituito da 218 bovine da latte in produzione, negli anni trascorsi ha spesso presentato positività ai test sierologici nei confronti della PTBC.

Nella sperimentazione sono stati processati un totale di 391 sieri, utilizzando come test di screening per la PTBC il test ELISA "ID Screen® paratuberculosis Indiretto" (IDVet Innovative Diagnostics, Montpellier-France). Gli animali risultati positivi o dubbi sono stati sottoposti ad accertamenti per la ricerca diretta del MAP dalle feci mediante PCR ed esame colturale, al fine di confermarne la positività.

La PCR diretta dalle feci è stata eseguita omogeneizzando, in ribolyzer per 45 secondi alla massima velocità, 200 mg di feci in buffer ASL (Qiagen buffer ASL stool lysis buffer). Il DNA è stato successivamente estratto da 200 µl di omogenato con kit Qiagen (DNA mini kit blood and body fluid). L'amplificazione è stata effettuata con una Nested PCR come descritto da Millar *et al.* (5)

L'esame colturale dalle feci è stato eseguito mediante la metodica per sedimentazione descritta da Arrigoni *et al.(*6), utilizzando terreno all'uovo di Herrold, con aggiunta di mycobactin.

Sono stati considerati positivi per PTBC gli animali risultati positivi ad almeno uno dei test di conferma.

Stimolazione *in vitro* e Test ELISA per γ-IFN: I campioni di sangue eparinizzato sono stati dispensati in aliquote da 1,5 ml in piastre da 24 pozzetti e stimolati rispettivamente con solo PBS; 30 µg di PPD bovina e 30 µg di PPD aviare Australiane (AgriQuality Australia Pty Ltd,Victoria, Australia) (AA e BA); 10 µg di PPD bovina e 10 µg di PPD aviare Italiane (AP e BP) prodotte presso il nostro Istituto (7); 6 µg di Antigeni ricombinanti rESAT6/CFP10 forniti dal Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi Bovina da M.bovis. Dopo 24 ore di incubazione, si è proceduto alla raccolta dei surnatanti e la successiva valutazione del γ-IFN è stata eseguita con kit Elisa "*M.bovis* Gamma Interferon test Kit for Cattle" (BOVIGAM®). I valori ottenuti, espressi in unità di densità ottica (OD) rilevata a 450 nm, sono stati interpretati considerando come positivi valori di OD ≥ al doppio dell'OD riscontrata nei pozzetti con solo PBS (2N) (8,9). Sono state calcolate quindi le differenze tra le OD dei campioni e il rispettivo valore di 2N. Il confronto tra le medie delle differenze tra la stimolazione con rRESAT6/CFP10 e con le PPDs Bovine Australiane ed Italiane è stato valutato tramite test *t* di Student per valori di $p \leq 0,01$.

La specificità delle PPDs Bovine e del mix rRESAT6/CFP10

nei confronti della TB è stata calcolata nei bovini utilizzando come gold standard l'IDT.

Antigeni ricombinanti: i geni ESAT-6, CFP-10, sono stati amplificati tramite PCR con *primers* specifici utilizzando il DNA genomico di un isolato di *Mycobacterium bovis* (n°194/1999). I frammenti amplificati sono stati prima clonati nel vettore pCR-blunt II-TOPO e poi trasferiti nel vettore di espressione pQE30 a valle del *tag* 6xHistidine.

L'espressione delle proteine ricombinanti sono state messe a punto nel ceppo di *E.coli* BL21 Rep4. La proteina CFP-10 può essere purificata in condizioni native mentre la proteina ESAT-6 deve essere purificate in condizioni denaturanti (8M Urea). La purificazione delle proteine ESAT-6 e CFP-10 è stata effettuata seguendo il protocollo descritto da Colangeli et al., (10).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 391 animali 50 sono risultati positivi al test di screening; di questi, 48 sono stati confermati positivi per PTBC. In particolare 11 sono risultati positivi alla PCR da feci, 11 all'esame colturale e 26 ad entrambi i test. I risultati della stimolazione con le diverse PPDs e l'rESAT6/CFP10 sono mostrati in Figura 1.

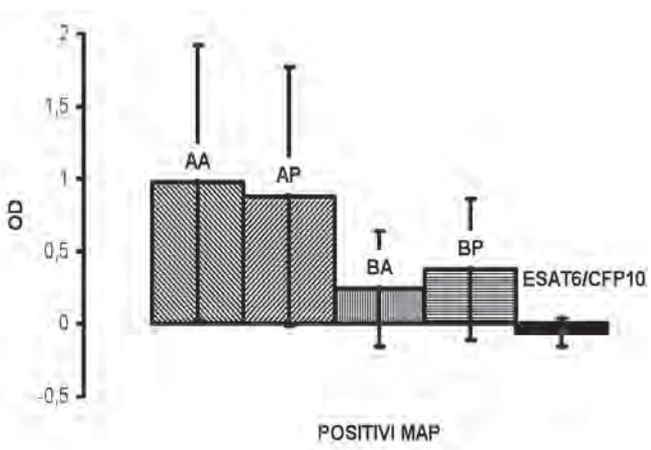


Figura 1 Produzione di γ-IFN nei linfociti stimolati con le diverse PPDs e con rRESAT6/CFP10. I valori sono espressi come Media delle differenze tra l'OD_{450} e il doppio dell'OD_{450} riscontrata con solo PBS ± Deviazione Standard.
AA: PPD Aviare Australiana; AP: PPD Aviare Italiana; BA PPD Bovina Australiana; BP: PPD Bovina Italiana; RESAT6/CFP10: Antigeni Ricombinanti

Le differenze tra rESAT6/CFP10 e BA e tra rESAT6/CFP10 e BP sono risultate significative con un $p < 0.01$. I valori di specificità delle PPDs Bovine e degli antigeni ricombinanti sono mostrati in Tabella 1. Le PPD bovine italiane sono poco specifiche (20,83 %); le australiane risultano avere una specificità intermedia (25 %); l'ESAT 6/CFP 10 possiedono rispetto alle precedenti una specificità più elevata (85,42%).

Antigeni	Specificità (%)
rRESAT6/CFP10 +	85,42
PPD Bovina australiana	25,00
PPD Bovina italiana	20,83

Tabella 1: Valori di specificità delle PPD bovine e degli antigeni ricombinanti.

L'obiettivo che ci si era posti era quello di verificare se la risposta allo stimolo con rRESAT6/CFP10 nei bovini infetti da PTBC contribuisse ad identificare tali soggetti come negativi per la TB. Analizzando i risultati del test *t* e le specificità delle PPDs bovine e l'rESAT 6/CFP10 possiamo concludere che gli antigeni ricombinanti non stimolano una risposta nei soggetti negativi all'IDT ed infetti da *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e quindi l'utilizzo degli antigeni ricombinanti sembra essersi rivelato efficace nell'aumentare la specificità del test.

Lo schema interpretativo adottato presso il nostro Istituto (8,9), che considera anche i rapporti tra i valori di OD delle PPDs bovine ed aviari, sia australiane che italiane, permette di identificare correttamente gli animali come negativi per *M. bovis* e reattivi nei confronti di *M. avium*, compensando le basse specificità delle PPDs bovine considerate singolarmente.

BIBLIOGRAFIA

1. Pollock J.M. and Neill S.D., (2002) Review *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. The Veterinary Journal 163: 115-127.

2. de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. (2006) Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci. 2006 Oct;81(2):190-210.

3. H.M. Vordermeier, A. Whelan, P.J. Cockle, L. Farrant, N. Palmer and R.G. Hewinson, (2001) Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8 pp. 571–578

4. W.R. Waters, B.J. Nonnecke, M.V. Palmer, S. Robbe-Austermann, J.P. Bannantine, J.R. Stabel, D.L. Whipple, J.B. Payeur, D.M. Estes, J.E. Pitzer and F.C. Minion (2004) Use of recombinant ESAT6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by Mycobacterium bovis and by M. avium subsp. avium and M. avium subsp paratuberculosis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11 (4), pp. 729–735.

5. Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J.(1996).IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. Appl Environ Microbiol. 62(9):3446-52.

6. Arrigoni N.,Cesena C., Belletti G.L., Pravettoni D., Belloli A. (2004) Presenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*nel latte di bovine con infezione subclinica: dati preliminari per l'analisi del rischio

7. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Chapter 2 . 4 . 7 . , 683-697

8. Dondo A., Goria M., Moda G., Cesano L., Garanzini A., Giammartino M., Minola G., Morioni E., Porta G., Banchio P., Marmo G. (1996). La prova del γ- interferone per la diagnosi della tubercolosi bovina: determinazione della sensibilità e della Specificità in prove di campo. Medicina Veterinaria Preventiva 13, 14-18.

9. Cagiola M., Feliziani F., Severi G., Menichelli M., Pasquali P., Rutili D. 2003. Impiego del gamma-interferon negli allevamenti bovini in Umbria. V Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Pisa, 20-21 Novembre 2003 Atti 75-76.

10. Colangeli R, Heijbel A, Williams AM, Manca C, Chan J, Lyashchenko K, Gennaro ML. (1998) Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis. J Chromatogr. B Biomed Sci Appl. Sep 4;714(2):223-35

POSTERS

LIVELLI PLASMATICI DI SEROTONINA NEL CAVALLO: EFFETTO DEL TRATTAMENTO DEI CAMPIONI IN FASE PREANALITICA

Alberghina D., Monteverde V (*)., Arnone M (*)., Sposito P (*)., Piccione G.,
Dipartimento di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate. Polo Universitario dell'Annunziata, 98168, Messina
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, "A. Mirri" (*)

SUMMARY

Plasma serotonin (f5-HT) concentration is commonly used to provide information about human serotoninergic activity. Equine f5-HT has been investigated more recently in physiological and pathological conditions but effect of sample preparation method on equine f5-HT levels has not yet been standardized and f5-HT show wide variability. We measured equine f5-HT in platelet poor plasma collecting blood in heparin and in EDTA and separating plasma to whole blood within one hour or two hours after the collection. The mean plasma 5-HT level in EDTA was about half of that in heparin plasma. Levels were significantly increased in samples centrifuged two hours after the blood collection. References values of f5-HT concentration in healthy horses (n=12) obtained by blood in EDTA centrifuged within one hour after collection are 27.21 ± 7.9 ng/ml (mean± SD).

Keywords: serotonina, plasma, Cavallo

INTRODUZIONE

La serotonina (5-HT) è un neurotrasmettitore centrale e periferico coinvolto nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche. Il dosaggio della 5-HT a livello centrale non è realizzabile in vivo e le indagini sulle funzionalità serotoninergica sono state ampiamente effettuate dosando la 5-HT presente nel plasma (f5-HT) e nelle piastrine. La f5-HT nell'Uomo sembra essere correlata con la 5-HT del liquido cefalorachidiano (8) ed è quindi valutata come marker periferico della funzionalità serotoninergica. La maggior parte della 5-HT circolante è contenuta all'interno delle piastrine che pur non sintetizzandola la captano o la rilasciano in circolo a seguito di numerose condizioni fisiologiche e patologiche. E' pertanto particolarmente importante che la separazione del plasma dalla parte corpuscolata mediante centrifugazione avvenga in maniera tale da impedire l'attivazione piastrinica con conseguente rilascio di 5-HT nel plasma. Le piastrine sono cellule molto sensibili e la loro separazione dal plasma in *vitru* deve essere accuratamente effettuata (6).

Nel Cavallo i livelli di f5-HT sono stati studiati in soggetti alimentati con diete differenti (1), dopo ingestione di endotossine e amine (2), in soggetti affetti da atipie comportamentali (4) e da sindrome di Cushing (3). Nella Specie Equina i livelli f5-HT (4; 1; 3) risultano più elevati rispetto a quelli riscontrati nell'Uomo (6) probabilmente poiché le piastrine umane presentano, rispetto a quelle di altre specie, un numero di granuli contenenti serotonina molto basso (5). Sulla base di queste conoscenze appare importante la standardizzazione del metodo di preparazione del campione di plasma equino proprio perché un suo errato trattamento può alterare i livelli di f5-HT sia aumentandoli, a seguito di attivazione piastrinica, sia diminuendoli, per la rapida ossidazione della f5-HT durante le fasi di preparazione e conservazione del plasma. Scopo della presente indagine è stato quello di studiare l'effetto dell'impiego di due differenti anticoagulanti -EDTA ed eparina- e del tempo di separazione del plasma povero in piastrine (PPP) dal sangue intero – entro un'ora e dopo due ore dal prelievo- sui livelli di f5-HT nella specie equina.

MATERIALI E METODI

L' indagine è stata condotta su 12 Cavalli (8 maschi e 4 femmine), clinicamente sani di età compresa tra 1 e 5 anni. I prelievi di sangue sono stati ottenuti mediante venopuntura della giugulare e i campioni sono stati raccolti mediante venoject contenenti EDTA e eparina in doppio. I campioni sono stati centrifugati a 1350 x *g* per 20 min per ottenere la frazione di plasma povero in piastrine (PPP) entro 1 ora (T_1) e dopo 2 ore (T_2) dal prelievo. Il plasma ottenuto è stato addizionato a standard interno (5-metilserotonina) e a reattivo precipitante (Chromosystem) e centrifugato (1). Il surnatante ottenuto è stato conservato a -20 ° C fino al momento delle analisi. Dopo scongelamento a temperatura ambiente, su ogni campione è stata determinata la f5-HT mediante metodica HPLC con rivelatore elettrochimico. L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata condotta mediante t test di Student per dati appaiati. La significatività statistica è stata considerata per $P<0.05$. I dati sono stati analizzati utilizzando il software STATISTICA 5.5 (Stat. Soft. Inc.tuba.OK.USA).

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1. Il t test di Student per dati appaiati ha permesso di evidenziare un significativo effetto dell'anticoagulante sui livelli medi di f5-HT con valori significativamente più bassi ($P<0.005$) ottenuti da campioni in EDTA rispetto a quelli da campioni in eparina sia a T_1 che a T_2. Anche l'effetto dell'intervallo di tempo dalla separazione del PPP è risultato statisticamente significativo. I livelli di f5-HT sono significativamente più elevati del 28% ($P<0.005$) nei campioni in EDTA e del 34% ($P<0.001$) nei campioni in eparina nel tempo T_2 rispetto al tempio T_1 (Figura 1). I valori di riferimento proposti in questo studio per la f5-HT nel Cavallo sono 27.21±7.9 ng/ml ricavati da campioni in EDTA centrifugati entro un'ora dal prelievo. Dai risultati ottenuti è possibile evincere che i livelli di f5-HT sono significativamente influenzati dalle procedure di trattamento dei campioni in fase preanalitica. L'effetto dell'anticoagulante sui livelli di f5-HT potrebbe essere spiegato ipotizzando una differente attivazione piastrinica in presenza di EDTA o di eparina. La maggiore aggregabilità di piastrine umane in campioni raccolti in eparina rispetto a quelli in EDTA (9) potrebbe supportare l'ipotesi che l'eparina inducendo una maggiore aggregabilità anche nelle piastrine equine possa aumentare i livelli di f5-HT rispetto all'utilizzo dell'EDTA. Questi risultati concordano con quanto riportato in letteratura su livelli di f5-HT nella Specie Equina più bassi quando si utilizza come anticoagulante l'EDTA (1;3) piuttosto che l'eparina (4). A temperatura ambiente è stata osservata una riduzione per effetto del tempo dell'aggregabilità piastrinica nel plasma umano (10), nel nostro studio i livelli significativamente aumentati di f5-HT nell'intervallo di tempo più ampio tra il prelievo e la centrifugazione potrebbero essere ricondotti alla presenza nel sangue intero di agenti fortemente

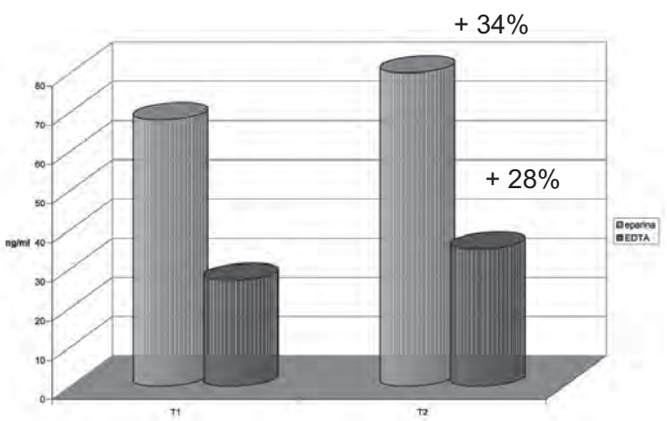
aggreganti quali il fattore di aggregazione piastrinca (PAF) o l'adenosindifosfato (ADP) rilasciati rispettivamente dai leucociti e dai globuli rossi. Su queste basi un ulteriore sviluppo della ricerca sarà effettuare la separazione del PPP in tempi più brevi allo scopo di standardizzare le procedure preanalitiche per il dosaggio della f5-HT per fornire nella Specie Equina ulteriori conoscenze relative alle dinamiche fisiopatologiche di questo marker periferico della funzionalità serotoninergica.

Tabella 1. Effetto del diverso tipo di anticoagulante e del diverso
tempo di separazione del plasma dal sangue intero sui livelli di
f5-HT (media ± D.S.) di Cavallo.

	f5-HT (ng/ml)	
Anticoagulante	T_1 (1 ora)	T_2 (2 ore)
EDTA	27.21±7.9	37.86 ± 7.07 [b]
Eparina	59.67±5.31 [a]	80.17±14.33 [a c]

Significatività : vs EDTA [a] $P<0.005$; vs T_1: [b] $P<0.005$;
[c] $P<0.001$

Figura 1. Rappresentazione grafica e aumento percentuale dei livelli di f5-HT in campioni ottenuti in EDTA e in eparina e centrifugati entro un'ora (T_1 e) e dopo 2 ore (T_2) dal prelievo.



Tempo di separazione (ore)

Bibliografia

1. Alberghina, D., Bruschetta, G., Campo, G. M., Campo, S., Medica, P., Ferlazzo, A. M. (2006) Influence of diet and sex differences on plasma serotonin and tryptophan of trained Thoroughbreds. In Management of lameness causes and sport horses: muscle, tendon, joint and bone disorders. Arbeitsgruppe Pferd, Wageningen Academic Publishers, Arno Lindner Ed, pp149-152. 2

2.Bailey SR, Cunningham FM, Elliott J. (2000). Endotoxin and dietary amines may increase plasma 5-hydroxytryptamine in the horse. *Equine Vet J.* 32(6):497-504

3. Haritou SJ, Zylstra R, Ralli C, Turner S, Tortonese DJ (2008). Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod. *J Neuroendocrinol.* 20(8):988-96.

4. Lebelt, D., Zanella, A.J., Unshelm J. (1998) Physiological correlates associated with cribbing behaviour in horses: changes in thermal threshold, heart rate, plasma beta-endorphin and serotonin. *Equine Veterinary Journal Supplement* 27, 21-27.

5. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL., 1982. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol*. 243(3):454-61.

6. Middelkoop CM, Dekker GA, Kraayenbrink AA, Popp-Snijders C.1993. Platelet-poor plasma serotonin in normal and preeclamptic pregnancy. *Clin Chem*.;39(8):1675-8.

7.Morgadinho MT, Fontes Ribeiro CA, Macedo TR., 2004. Influence of the sample preparation method on the serotonin determination in plasma and platelets. *Biomed Chromatogr.* 18(9):739-44.

8. Sarrias, M. J., Cabré, P., Martinez, E., Artigas, F. (1990). Relationship between serotoninergic measures in blood and cerebrospinal fluid simultaneously obtained in humans. *Journal of Neurochemistry* 54, 783-786.

9.Shojania AM, Turnbull G. (1987) Effect of heparin on platelet count and platelet aggregation. *Am J Hematol.* 26(3):255-62.

10.Watts SE, Tunbridge LJ, Smith K, Lloyd JV (1986). Storage of platelets for tests of platelet function: effects of temperature on platelet aggregation, platelet morphology and liberation of beta-thromboglobulin. *Thromb Res.* 1;44(3):365-76.

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO HPLC-MS PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI FUMONISINE B_1 E B_2 IN ALIMENTI AD USO ZOOTECNICO

Amato G., Marchis D., Mauro C., Ferro G.L., Loria A., Abete M.C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
C.Re.A.A. – Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza ed il Controllo degli Alimenti per Animali
Via Bologna, 148 – 10154 Torino

Key words: fumonisine, HPLC-MS, mangimi

INTRODUZIONE

Le Fumonisine costituiscono un gruppo di metaboliti tossici prodotti da funghi del genere Fusarium, frequentemente riscontrati nel mais e in alimenti e mangimi a base di mais. Il particolare tipo di intossicazione cui le fumonisine possono dare origine negli organismi umani ed animali, prevede un decorso tipicamente a carattere cronico, e con danni progressivi ed irreversibili solitamente localizzati a livello di ben specifici organi e tessuti. Tuttavia i dati a disposizione relativi al trasferimento delle fumonisine dal mangime ai tessuti commestibili, latte e uova compresi, indicano che il carry-over di queste micotossine è modesto (1).
Nella Tabella 1 sono riportati i valori limite per la B_1 e B_2 indicati dalla Comunità Europea e in vigore dal 1° ottobre 2007 (2).

Tabella 1

Matrici	*Valori di riferimento espressi in mg/Kg al 12% di umidità*
Granoturco e prodotti derivati	60
Mangimi completi e complementari per:	
suini, equini, conigli e animali da compagnia	5
pesci	10
Pollame, vitelli (<4 mesi), agnelli, capre	20
Ruminanti adulti (>4 mesi) e visoni	50

Nel presente lavoro descriviamo lo sviluppo e la validazione di un metodo per la determinazione quantitativa delle Fumonisine B_1 e B_2 in alimenti ad uso zootecnico.

MATERIALI E METODI

Per le prove di sviluppo metodo e di validazione sono stati utilizzati mangimi rappresentativi delle specie animali indicati nella normativa.
SVILUPPO METODO – 25 g di mangime sono estratti con 125 mL di metanolo/acetonitrile/acqua = 25/25/50 (V/V/V) in presenza di NaCl (2,5 g) in agitatore rotante per 15 minuti; l'estratto è filtrato su filtro di carta a pieghe e diluito 1:20 con tampone PBS. L'estratto diluito è purificato su colonne IAC Fumoniprep® e sottoposto ad analisi HPLC su colonna cromatografica RP 18 (150 x 2.00 mm i.d., 4 µm) e con rivelatore MS con trappola ionica in modalità ioni positivi MS^2 (i parametri sono riportati in Tabella 2).

Tabella 2

Fumonisina B_1		*Fumonisina B_2*
722	Ione precursore	707
704, 528, 352	Ioni prodotto	688, 512, 336
704	Ione quantificatore	688

La separazione cromatografica avviene utilizzando come eluenti acido formico 0.1% e acetonitrile in gradiente, con un flusso di 0.25 mL/min e iniezione di 5 µL.

VALIDAZIONE – Il processo di validazione è stato condotto secondo le indicazioni del Reg. CE n. 882/2004, valutando i seguenti indici di prestazione

- Linearità della risposta – Valutata mediante tre curve indipendenti di soluzioni standard in solvente, a 6 livelli nel range 0.015-0.5 µg/mL corrispondenti a 0.9-30 mg/Kg in matrice, con costruzione della retta di taratura mediante l'algoritmo dei minimi quadrati non pesati, e verifica della linearità (R≥0.999, distribuzione dei fattori di risposta y_i/x_i, nell'intervallo y/x_{medio}±10%).
- Limite di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) Determinati sperimentalmente su 20 campioni negativi scelti tra le matrici oggetto della validazione, nel seguente modo:
  - Misura del rumore di fondo di ciascun cromatogramma nell'intervallo di tempo Δt = ±2.5% t_r standard.
  - Calcolo della media (M) dei rumori di fondo e dello scarto tipo (S).
  - Calcolo della risposta strumentale (B) corrispondente al LOD mediante la seguente formula: B= M + 3S
  - Conversione di B a LOD in concentrazione mediante curva di taratura altezza segnale vs. concentrazione corrispondente in matrice.
  - Calcolo del LOQ moltiplicando il valore di LOD per n=3.3.
- Specificità - Valutata su 20 campioni di mangimi, verificando nei singoli cromatogrammi che, nell'intervallo Δt = ±2.5% t_r standard, non fossero presenti interferenti, allo scopo di escludere l'eventualità di falsi positivi e di errori di quantificazione
- Recupero % - Determinato mediante 6 prove indipendenti a quattro livelli del campo di misura compreso il LOQ.
- Ripetibilità ristretta - Corrispondente al valore di RSD% medio, determinato mediante 6 prove indipendenti a quattro livelli del campo di misura compreso il LOQ.
- Robustezza - Valutata su fattori critici quali la percentuale di metanolo nella miscela di estrazione, tempo di estrazione e temperatura della colonna.
- Stabilità delle soluzioni standard - Verificata analizzando periodicamente la soluzione di standards conservata a 4°C al riparo dalla luce per rilevare la percentuale di decremento del titolo.

- Stima dell'incertezza di misura del metodo – L'incertezza del metodo è stata calcolata in accordo con la PGS 20AQ027 dell'IZSPLV, attraverso le seguenti fasi:
  1. Identificazione dei contributi all'incertezza di misura
  2. Calcolo dei contributi: incertezza di ripetibilità, pesata, volume, titolo dello standard, preparazione della soluzione di standard, curva di taratura, recupero
  3. Calcolo dell'incertezza composta
  4. Calcolo delle incertezze estese del metodo e del risultato

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metodo descritto consente un'analisi caratterizzata da una buna risoluzione dei picchi cromatografici relativi alle due fumonisine che eluiscono rispettivamente a 7.8 min (FB_1) e a 9.6 min (FB_2). La metodica di semplice esecuzione, affidabile e relativamente veloce, si presta bene all'analisi di routine.
Gli indici di prestazione ottenuti in fase di validazione sono riportati nella Tabella 3. Dall'osservazione dei dati è possibile rilevare come il metodo sviluppato consenta un ottimo recupero di entrambi gli analiti, con valori di precisione in accordo alla legge di Horwitz (3). I limiti analitici (LOD e LOQ) sono idonei allo scopo. La verifica del mantenimento delle condizioni di ripetibilità e recupero in routine sono garantite da carte di controllo del recupero.
Il metodo validato secondo questi criteri risulta conforme ai requisiti richiesti dalla norma ISO 17025.

Tabella 3

Risultati della validazione	
Matrice	Mangimi
Tecnica	HPLC-MS
Linearità	FB_1: R^2 = 0.9989 FB_2: R^2 = 0.9993
LOD (mg/Kg)	FB_1: 0.012 FB_2: 0.56
LOQ calcolato (mg/Kg)	FB_1: 0.039 FB_2: 1.85
LOQ adottato (mg/Kg)	FB_1: 2.0 FB_2: 2.0
Campo di misura (mg/Kg)	FB_1 e FB_2: 2-70 mg/Kg
Specificità	Verificata su mangimi
Recupero medio %	FB_1: 104.93 FB_2: 97.76
Precisione: rip. ristretta (RSD%)	FB_1: 4.15 FB_2: 4.3
Incertezza estesa del metodo	FB_1: 13% FB_2: 13%
Incertezza estesa del risultato	FB_1: 24% FB_2: 21%
Stabilità	Non inferiore a 6 mesi a 4° al buio

BIBLIOGRAFIA

(1) D'Mello J.P.F., Placenta C.M., Macdonald A.M.C., Fusarium mycotoxin: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, 1999, Animal Feed Science and Technology, 80, pp. 183-205
(2) Racc. CE n. 576 del 17/08/2006, (Gazz. Uff. dell'Unione Europea n. L 229 del 23/08/2006)
(3) Horwitz W., Laverne R., Kamps and Kenneth W. Boyer, 1980,J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63.

SUMMARY

A rapid and very effective analytical procedure for the liquid chromatographic determination of Fumonisine B_1 and B_2 in feed was developed and tested. The method validation study was performed according to Reg. 2004/882/EC criteria and the following parameters were determined: linearity, specificity, LOD, LOQ, recovery, precision, ruggedness, stability and uncertainty. The proposed method is suitable for quantitative official analysis.

PIANO DI CONTROLLO DELLA RINOTRACHEITE INFETTIVA BOVINA NELLA REGIONE LAZIO: RISULTATI DEL PIANO DI MONITORAGGIO SIEROLOGICO DEL 2007

Autorino G. L.[1]., Barone A.[1], Brozzi A[1]., Caprioli A.[1], Della Marta U[2]. Grifoni G.[1], Saralli G.[1],Scicluna M.T.[1],

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411, Roma.

[2]Assessorato per le Politiche della Sanità, Area Prevenzione collettiva e Servizi veterinari, Regione Lazio, Via Rosa Raimondi Garibaldi, 700145 Roma

Key Words: IBR; piano di monitoraggio; Regione Lazio

SUMMARY

The results of the monitoring plan conducted in the Latium Region in 2007, to evaluate the spread of Bovine Infectious Rhinotracheitis (IBR), are here reported together with the data of the serological testing carried out on farms adhering for the first time to the voluntary eradication programme. The monitoring was based on the serological testing of a maximum of 15 blood samples for each farm (expected prevalence 20%, standard error 5%, confidence intervals 95%), collected from breeding animals older than 9 months, with no history of administration of undeleted vaccines. For farms enrolled for the voluntary eradication program, all the animals were tested. The serological methods employed were the indirect IBR Elisa (ID VET), or the gE IBR Elisa (IDEXX) when the animals were vaccinated with the gE vaccine. Of the monitored farms, 48.9% resulted positive (6363 breeding units tested of the total registered in Latium, 51434 samples), with similar results obtained in all of the regional provinces, while for the adhering farms (198 units, 16449 samples) the positivity was 65%. While the latter farms registered a higher positivity, the intra-farm prevalences were relatively low. In fact, the medians of the prevalences, estimated for each province, ranged from 0%, for the province of Rome, to 18.2% for the province of Rieti. Attempts to compare the results derived from the Latium IBR monitoring plan were unsuccessful due to the lack, inaccessibility or differences of databases collecting information for the verification of past/on-going IBR control programmes.

INTRODUZIONE

L'IBR è considerato un problema rilevante e prioritario di sanità animale in molti paesi nel mondo. Nel 2004, la Commissione Europea, con la Decisione n. 558, ha stabilito le modalità d'applicazione con la Direttiva 64/432/CEE, in merito alle garanzie complementari per gli scambi intracomunitari di animali della specie bovina in relazione all'IBR e contestualmente, ha approvato i programmi di eradicazione, di alcuni Stati Membri. Attualmente, la situazione epidemiologica europea nei confronti dell'IBR, si presenta disomogenea: paesi quali Norvegia, Svezia, Finlandia, Danimarca, Austria e Svizzera hanno da anni eradicato l'infezione. In altri paesi, in cui l'infezione è ancora presente, i piani sono attuati o a livello nazionale come per Germania, Belgio, Olanda, Ungheria, Repubblica Ceca e Slovacchia, o a livello di alcune regioni dello stesso paese, come in Italia, Francia e Spagna. In particolare, le Regioni Italiane, su richiesta del Ministero della Salute (Circolare n. DGVA. VIII/28926/-I.8.d/368 del 14/09/2004), sono state raccomandate di istituire piani di controllo nei confronti dell'IBR. Ad oggi, solo le province autonome di Bolzano e Trento applicano piani di eradicazione obbligatori e risultano indenni dall'infezione. Per il resto del paese, piani di eradicazione su base volontaria sono stati approvati per la provincia di Belluno e per le Regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte, Toscana, Lazio e Campania. Nel Lazio, il piano di controllo volontario dell'IBR è stato approvato dalla Regione con DGR 876 del 18/12/2006, affidandone l'attuazione all'Istituto Zooprofilattico delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT) e ai Servizi Veterinari Territoriali.

La strategia del piano si articola principalmente su tre punti, quali:

- Attività di monitoraggio sierologico negli gli allevamenti da riproduzione a carattere obbligatorio, da concludere entro un anno dalla data di pubblicazione del DGR;
- Piano di Eradicazione ad adesione volontaria per l'attribuzione della qualifica di indennità;
- Controllo sierologico obbligatorio dei soggetti in compravendita.

In questo lavoro sono riportati i risultati del monitoraggio, effettuato per valutare la diffusione dell'infezione in ambito regionale. Inoltre, sono rappresentati i dati relativi ai primi controlli sierologici condotti negli allevamenti in adesione al piano per l'anno 2007.

MATERIALI E METODI

La base campionaria per l'attività di monitoraggio sierologico, effettuata su bovini da riproduzione, è stata definita come indicato nella tabella 1, (prevalenza attesa del 20%, E.S, del 5% e I.C. del 95%).

Tabella 1 - Numerosità campionaria per allevamento

Allevamenti con meno di 16 capi di età superiore a 9 mesi	Allevamenti con più di 15 capi di età superiore a 12 mesi
Controllo di tutti i soggetti	Controllo di 15 soggetti privilegiando i capi in produzione*

**probabilità di sieropositività aumenta con l'età del soggetto*

Nelle aziende di adesione venivano prelevati ed esaminati tutti i soggetti, di età superiore a 9 mesi, esclusi animali con storia di vaccinazione con vaccino non-deleto. I campioni di sangue per l'esecuzione delle analisi, effettuati presso i laboratori dell'IZSLT, dovevano essere accompagnati da un'apposita scheda, compilata dal veterinario ASL, in cui erano riportate anche informazioni riguardanti gli eventuali trattamenti vaccinali in corso o effettuati in passato, specificandone la tipologia. Sulla base di tali informazioni, i campioni sono stati esaminati impiegando i seguenti test sierologici, escludendo dalla base campionaria i soggetti vaccinati con i vaccini non deleti:

- campioni di soggetti mai vaccinati: kit IBR Elisa anticorpi totali (ID VET);
- campioni di soggetti vaccinati vaccino gE deleto: kit IBR anti-gE blocking Elisa (IDEXX).

I risultati sono stati espressi seguendo le procedure fornite dal produttore.

RISULTATI

Gli allevamenti monitorati sono stati 6363, che rappresentavano il 48,9% del totale degli allevamenti registrati nell'anagrafica bovina della Regione per il 2007: nel denominatore di questa percentuale erano incluse, oltre che le aziende da riproduzione oggetto di monitoraggio, anche quelle con altri indirizzi produttivi. Il numero di aziende che hanno aderito al Piano Volontario di Eradicazione nel corso dell'anno in esame sono state 198. Nel complesso, i campioni analizzati sono stati

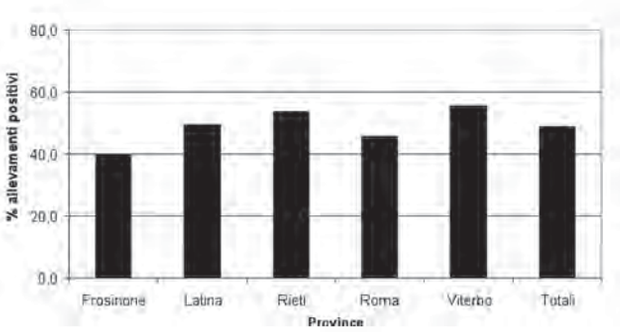
67883, di cui il 24,2% (16449) provenivano da allevamenti in adesione.
Nella tabella 2 sono riportati in dettaglio il numero di allevamenti monitorati ed in adesione ed il numero di campioni analizzati, suddivisi per provincia.

Tabella 2. N° Allevamenti e campioni controllati per IBR – Province Lazio (2007)

Province	Monitoraggio		Adesione		TOTALE n° camp
	n° all.	n° camp	n° all.	n° camp	
Frosinone	2032	12561	1	28	12589
Latina	891	10975	27	2085	13060
Rieti	1421	10814	15	568	11382
Roma	1347	12047	74	8207	20254
Viterbo	474	5037	81	5561	10598
TOTALI	6165	51434	198	16449	67883

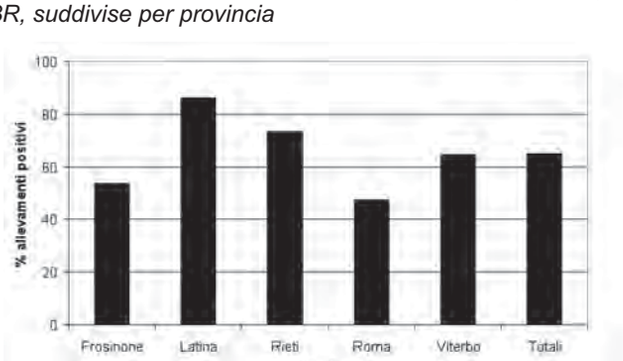
Per i risultati relativi al monitoraggio, la percentuale di allevamenti con almeno un capo IBR positivo era pari al 48,9%, valore che è risultato quasi omogeneo per tutte le province; la percentuale più elevata (55,4%), è stata riscontrata nella provincia di Viterbo, quella più bassa (40,1%) nella provincia di Frosinone (Grafico 1).

Grafico 1. Percentuale di allevamenti monitorati positivi per IBR, suddivise per provincia



Per gli allevamenti in adesione, la percentuale di positività riscontrata era pari al 65%; il valore più elevato (86,1%), è stato riscontrato per gli allevamenti della provincia di Latina, quello più basso (47,3%) per quelli della provincia di Roma (Grafico 2).

Grafico 2. Percentuale di allevamenti in adesione positivi per IBR, suddivise per provincia



Per ogni provincia, si è proceduto inizialmente al calcolo delle percentuali di positività intra-aziendali e successivamente, sui valori ottenuti, sono state stimate la mediana della prevalenza intra-aziendale (Tabella 3). La provincia con la mediana più bassa è risultata essere quella di Roma, in cui il 50% degli allevamenti sono risultati indenni da IBR, mentre la mediana più alta è stata osservata per la provincia di Rieti, dove almeno il 50% degli allevamenti avevano una prevalenza massima del 18,2%.

Tabella 3. Percentuale di allevamenti in adesione positivi per IBR e mediane delle prevalenze intra-aziendali, suddivise per provincia

Province	n° all	Pos %	Mediana	Percentile 5 °	Percentile 95°
Frosinone	1	53,6	/	/	/
Latina	27	86,1	14,4	0,0	94,5
Rieti	15	73,3	18,2	0,0	100
Roma	74	47,3	0,0	0,0	64,4
Viterbo	81	64,7	5,4	0,0	90,9
TOTALI	198	65,0	/	/	/

DISCUSSIONE

Il Piano di Eradiazione dell'IBR della Regione Lazio ha previsto per il primo anno un monitoraggio aziendale obbligatorio al fine di conoscere lo stato sanitario di partenza nei confronti dell'infezione. Contestualmente, si è proceduto a sensibilizzare, informare, formare e coinvolgere tutti gli stakeholders sugli obbiettivi, i vantaggi e le modalità di esecuzione del piano stesso.
In merito al dato relativo al monitoraggio, esiste una probabile sottostima della diffusione dell'infezione per gli allevamenti con riproduttori, avendo considerato nel totale delle aziende anche quelle con altri indirizzi produttivi.
Ad una maggiore percentuale di positività per gli allevamenti in adesione (65%) rispetto a quelli monitorati (48,9%), nonostante il limitato numero di aziende esaminate per i primi, corrisponde invece una prevalenza assoluta intra-aziendale tendenzialmente bassa: il 50% degli allevamenti esaminati risultava avere una prevalenza che oscillava tra lo 0% per la provincia di Roma e il 18,2% per la provincia di Rieti (Tabella 3). Tali allevamenti, si trovano già nelle condizioni di ottenere la qualifica di indennità in tempi brevi.
Il dati di prevalenza intra-aziendale, ripetuti nel tempo, oltre che per l'assegnazione della qualifica per l'indennità, saranno essenziali per la verifica dell'efficacia delle strategie di controllo adottate.
Avvalendosi dei risultai ottenuti, sia dagli allevamenti in adesione che da quelli in monitoraggio, le autorità competenti potranno pianificare obiettivi e strategie future e definire l'allocazione migliore delle risorse per ottenere il controllo/ eradicazione dell'IBR.
I risultati del monitoraggio condotto a livello regionale, sono difficilmente paragonabili con quelli ottenuti in altre regioni che hanno attuato o stanno attuando simili piani. Infatti, la fruibilità dei dati di tali piani nella maggiore parte dei casi è scarsa e quando disponibili, esiste inoltre l'estrema difficoltà di paragonare gli stessi a causa dei diversi approcci di campionamento, della etereogenicità delle popolazioni campionate e dei diversi approcci diagnostici impiegati.
In tal senso, sarebbe necessario un maggior co-ordinamento e una migliore gestione dei flussi informativi sia a livello locale che nazionale.

BIBLIOGRAFIA

1) Ackermann M. *et. al*., 2006. Pro and contra IBR-eradication. Veterinary Microbiology, 113, pp. 293-302.
2) Woodbine K.A. *et. al*. 2009. A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-I (BHV-I) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England. BMC Veterinary Research, 5:5; pp. 1-12.

PRESENZA DI *TOXOPLASMA GONDII* IN CARNI FRESCHE, PRODOTTI E PREPARAZIONI DI CARNI ABITUALMENTE CONSUMATI CRUDI IN PIEMONTE.

[1] Barbaro A., [2] Bianchi D.M., [2] Gallina S., [1] Chiavacci L., [3] Pavoni E., [3] Losio M.N., [2] Decastelli L.

[1] S.S. Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

[2] S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia

Key words: *Toxoplasma gondii*, **zoonosi, carni fresche**

SUMMARY

The aim of the study is to investigate the prevalence of *Toxoplasma gondii* in fresh meat and meat products intended to be eaten raw in Piedmont region. During 2008 we analysed 111 samples of fresh meat and meat products collected by the Veterinary Service during the activity of regional monitoring plan; samples were analyzed with molecular methods in order to identify DNA of the target parasite. We obtained a prevalence of *Toxoplasma gondii* between 20,7 to 31% with RT-PCR method and the confirmation rate with sequencing method was 87,5%.

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii è un protozoo intracellulare obbligato, agente di zoonosi (6). L'infezione nell'uomo può avvenire attraverso diverse fonti, ma è riconosciuto un ruolo importante agli alimenti di origine animale e vegetale contaminati, se consumati crudi o non adeguatamente cotti (7, 2).

Il rapporto pubblicato dall'EFSA (5) riporta che la toxoplasmosi rappresenta, nell'Unione Europea, la parassitosi più diffusa nell'uomo (0,6 casi segnalati ogni 100.000 abitanti nel 2004); tuttavia, data l'inadeguatezza degli attuali sistemi di sorveglianza e di segnalazione dei casi, la prevalenza del parassita nella popolazione umana, animale e negli alimenti risulta sicuramente sottostimata. Per la rilevazione di *T. gondii* in alimenti quali carne, latte, acqua, non sono disponibili ad oggi metodi diagnostici di riferimento: quelli esistenti sono sperimentali (tecniche di biologia molecolare) o non applicabili su larga scala (prove biologiche).

Sulla base del quadro descritto, l'EFSA esprime delle raccomandazioni rivolte agli Stati Membri sottolineando la necessità di attuare un monitoraggio efficace, al fine di ottenere dati utili per inquadrare lo scenario epidemiologico. Questo obiettivo è raggiungibile anche attraverso la messa a punto e validazione di protocolli diagnostici, in particolare per gli alimenti. Non a caso, la Direttiva 2003/99/CE (allegato I) (4), include la toxoplasmosi tra le zoonosi da parassiti da sottoporre a sorveglianza in funzione della situazione epidemiologica. Pertanto, non essendo disponibili, in Regione Piemonte, dati di prevalenza negli alimenti di origine animale, si è ritenuto opportuno effettuare un'indagine per quantificare la presenza di *Toxoplasma gondii* in carni fresche, prodotti e preparazioni a base di carni abitualmente consumati crudi.

MATERIALI E METODI

L'indagine ha previsto il campionamento minimo di 100 campioni di carni fresche, prodotti e preparazioni a base di carni abitualmente consumati crudi (es. salsicce, salami). E' stato predisposto un verbale di prelievo dedicato ed il campionamento è stato effettuato in aliquota unica dai Servizi Veterinari di tutte le AA.SS.LL. piemontesi, parallelamente all'attività ufficiale.

Il numero minimo di campioni è stato assegnato ad ogni ASL in funzione delle attività commerciali censite sul territorio di competenza.

Sono stati prelevati 111 campioni. Sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di *Toxoplasma gondii* **mediante RT-**PCR. La metodica prevede che alla retrotrascrizione (RT) segua la reazione di PCR, eseguita con primer specifici per una porzione del gene small-subunit (ssu-rRNA) 18S. Per l'esecuzione delle analisi è stato applicato un protocollo reperito dalla bibliografia internazionale (1).

I primer utilizzati sono stati i seguenti:

Tox 213 f: 5' CCGGTGGTCCTCAGGTGAT 3'

Tox 332 r: 5' TGCCACGGTAGTCCAATACAGTA 3'

La metodica si è articolata in fasi successive:

- preparazione del campione;
- estrazione dell' RNA totale (Nucleospin RNAII kit –Macherey Nagel®);
- allestimento della reazione di retrotrascrizione e della reazione di PCR (GeneAmp RNA PCRkit – Applied Biosystem®);
- analisi dei prodotti di reazione mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2,5% con Etidio Bromuro.

Il campione è stato considerato positivo se sul gel di agarosio risultava visualizzabile a transilluminatore UV la banda della dimensione attesa di 120 paia di basi (pb).

I campioni risultati positivi al metodo RT- PCR per la ricerca di *Toxoplasma gondii* sono stati sottoposti a sequenziamento genico con tecnica automatica a marcati fluorescenti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i campioni prelevati (N=111) sono stati analizzati con RT-PCR (vedere tabella 1).

Tabella 1: campioni esaminati con RT-PCR per accertare la presenza di Toxoplasma gondii

Matrice	N. campioni	N. negativi	N. positivi RT-PCR	% positivi RT-PCR
carni fresche	53	41	12	22,6
preparazioni di carne	29	23	6	20,7
prodotti a base di carne	29	20	9	31
totale complessivo	111	84	27	24,3

Dei 111 campioni, 27 (24,3%) hanno mostrato bande specifiche per la presenza di DNA di *Toxoplasma gondii* (120 pb).

Il sequenziamento è stato effettuato su 24 campioni in quanto 3 sono risultati non idonei all'analisi. Il sequenziamento ha confermato la presenza del DNA oggetto dello studio in 21 campioni (87,5%); 1 campione è risultato negativo ed altri 2 hanno mostrato un sequenziamento misto non leggibile (vedere tabella 2).

Tabella 2: risultati dei campioni sottoposti a sequenziamento per la presenza di Toxoplasma gondii

matrice	N. campioni sequenziati	N. campioni positivi al sequenziamento	% positività al sequenziamento
carni fresche	9	6	66,6%
preparazioni di carne	6	6	100%
prodotti a base di carne	9	9	100%
totale complessivo	24	21	87,5%

I risultati ottenuti con questo studio hanno mostrato percentuali di positività in RT-PCR (riportati in tabella 1) del 22,6% nelle carni fresche, del 20,7% nelle preparazioni di carne e del 31% nei prodotti a base di carne evidenziando che queste tipologie di alimento, se contaminate e consumate crude o non adeguatamente cotte, possono rappresentare un pericolo concreto nelle donne gravide, confermando i risultati ottenuti in precedenti studi svolti in Europa (3).
In conclusione, dai risultati ottenuti, appare quindi evidente che, sarebbe utile strutturare nel PRISA (Piano Regionale Integrato di Sicurezza Alimentare) un piano di campionamento utile alla corretta valutazione del rischio rappresentato dagli alimenti di origine animale senza escludere quelli vegetali.

BIBLIOGRAFIA

1. Arkush D.K., Miller M.A., Leutenegger C.M., Gardner I.A., Packham A.E., Heckeroth A.R., Tenter A.M., Barr B.C., Conrad P.A. (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (mytilus galloprovincialis). International Journal for Parasitology 33 (10): 1087-1097
2. Aspinall T.V., Marlee D., Hyde J.E., Sims P.F.G. (2002). Prevalence of Toxoplasma gondii in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? International Journal for Parasitology 32,1193–1199.
3. Cook A.J.C., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey, J., Petersen E., Jenum P.A., Foulon W., Semproni A.E. and Dunn D.T. (2000). Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicenter case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *Br. Med. J.* 321, 142-147
4. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della Decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. 12/12/2003. L325/25-L325/40.
5. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *The EFSA Journal* (2007), 583 1-64
6. Tenter A.M., Heckeroth A.R., and Weiss L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30:1217-58.
7. Warnekulasuriya M.R., Johnson J.D., Holliman R.E. (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. International Journal of Food Microbiology, Volume 45, Issue 3, 22 December 1998, Pages 211-215

CONFRONTO FRA IL METODO ISO 6579:2002 E IL METODO ISO 6579:2002/Amd 1:2007 PER LA RICERCA DI *Salmonella* spp. IN CARCASSE DI TACCHINO

Bardasi L.[1], Giommi E.[2], Fontana M.C.[1], Galletti G.[1], Merialdi G.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia Romagna ;
[2]Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna

Key words: *Salmonella* spp., turkey neck skin, methods

ABSTRACT
Salmonella spp. is an important cause of foodborne disease in humans. The aim of the present study was to compare the ability of the international standard method ISO 6579:2002 used for isolation of *Salmonella* spp. in poultry carcasses (neck skin samples) to ISO 6579:2002/Amd.1:2007 , used for isolation of *Salmonella* spp. in faeces and environmental samples. 235 samples of turkey neck skin were examined for *Salmonella* spp..The results obtained with two method showed no differences: k =0,93 (IC 95%: 0,88 – 0,98).

INTRODUZIONE
Salmonella continua a essere la causa più frequente di focolai di tossinfezioni alimentari nell'Unione Europea.
Dati comunitari relativi ai livelli di salmonella rilevati in allevamenti di tacchini commerciali dell'UE negli anni 2006-2007, indicano che più di un terzo degli allevamenti dei tacchini allevati a scopo alimentare (30,7%) ed il 13% degli allevamenti dei tacchini da riproduzione risulta positivo per almeno un ceppo di salmonella.(5)
Il Regolamento (CE) n.2073/2005 (e successive modifiche) prevede per le carcasse di pollame (broilers e tacchini) il campionamento della pelle del collo in fase di macellazione per ricerca *Salmonella* spp.. Il campionamento deve essere effettuato dopo il raffreddamento delle carcasse.(4)
Il metodo d'analisi di riferimento indicato nell'Allegato I del Reg.2073/2005 per l'esecuzione di questi controlli è la norma ISO 6579. (2)
Nella pratica di laboratorio questi campioni risultano contaminati da flora microbica varia, derivante da quella presente sulla cute e da quella derivante da contaminazioni fecali in fase di macellazione, che talvolta rende difficoltoso l'isolamento dei microrganismi riferibili a Salmonella spp..
Per tale motivo si è valutato di applicare in parallelo al metodo di prova ISO 6579:2002 il metodo ISO 6579:2002/Amd 1:2007, che prevede l'utilizzo del Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV).(1)
Quest' ultimo è il metodo di riferimento per la ricerca di *Salmonella* spp. in feci e matrici ambientali. La selettività di questo metodo si basa sulla abilità di *Salmonella* a migrare attraverso il mezzo semisolido (MSRV) producendo un alone opaco biancastro. Il pH relativamente basso minimizza la migrazione della maggior parte delle Enterobatteriacee mobili, ad eccezione della *Salmonella*, di *Enterobacter cloacae* e di *Citrobacter freundii.* La crescita di questi ultimi due generi è inibita dall'aggiunta di novobiocina e dall' incubazione a +41,5 °C. (7)
Altri agenti selettivi presenti nel MSRV sono verde malachite e Cloruro di Magnesio ad elevate concentrazione.
L'obiettivo del presente studio è di valutare l'efficienza del metodo ISO 6579:2002/Amd 1:2007 nell' isolare *Salmonella* spp. rispetto al metodo ufficiale ISO 6579:2002 su una matrice generalmente esposta ad elevata contaminazione fecale e ambientale.

MATERIALI E METODI
Nell'ambito dei controlli previsti dal Reg. 2073/2005, vengono routinariamente esaminati campioni di pelli di tacchino costituti da 5 unità campionarie per la ricerca di *Salmonella* spp..
Questi campioni, che risultano frequentemente contaminati da *Salmonella* spp., sono stati utilizzati per effettuare un confronto fra il metodo di prova previsto dal Reg. 2073/2005 e il metodo di prova ISO 6579:2002/Amd 1:2007 applicabile su feci e campioni ambientali prelevati nell'ambito della produzione primaria.
Sono stati esaminati in parallelo con i due metodi 235 campioni. La fase di prearricchimento è comune ai due metodi di prova: ciascun campione (presa di saggio di 25g) è stato addizionato di 225 ml di Acqua Peptonata Tamponata ed incubato a 37°C ± 1 °C. Successivamente, dallo stesso prearricchimento, sono stati effettuati i trapianti in terreni di arricchimento selettivi: Mueller Kauffmann Tetrathionate broth addizionato di novobiocina (MKTTn), Rappaport Vassiliadis broth addizionato di soia (RVs); Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis medium (MSRV). MKTTn è stato incubato a 37°C ± 1 °C per 24 ore , Rvs e MSRV sono stati incubati a +41,5 ± 1 °C per 24 ore. Mentre i due brodi di arricchimento selettivo sono stati trapiantati sui terreni selettivi Xylose Lysine Deoxycholat Agar e Brilliant Green Agar in base a quanto previsto dalla ISO 6579:2002, il trapianto dal MSRV su terreni solidi selettivi è stato eseguito solo nel caso in cui fosse stato evidenziato alone di crescita in piastra dopo 24-48 ore di incubazione. Dai terreni solidi, entrambi incubati a 37°C ± 1 °C per 24 ore, le colonie sospette sono state identificate attraverso test biochimici e sierologici.
Nella figura n. 1 sono schematizzati i flussi operativi relativi ai due metodi utilizzati.

Figura n. 1 – Flussi operativi dei metodi ISO 6579:2002 *e ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (MSRV)*

Pre-arricchimento		
25g campione + 225ml BPW 18h, 37°C ± 1°C ↓		
Arricchimento selettivo		
ISO 6579:2002		**ISO 6579:2002 / Amd 1:2007**
0.1ml BPW in Rvs ↓ 41.5°C ± 1°C 24±3 h ↓ XLD BGA 24±3 h ↓ screening XLD e BGA	1ml BPW in MKTTn ↓ 37°C ± 1°C 24±3 h ↓ XLD BGA 24±3 h ↓ screening XLD e BGA	0.1ml BPW in MSRV ↓ 41.5°C ± 1°C 24±3 h ↓ se positivo dopo 24-48 h XLD e BGA ↓ screening XLD e BGA

Sui dati raccolti è stato calcolato il Kappa di Cohen per la valutazione dell'accordo tra le risposte qualitative fornite dai due metodi. Il Kappa di Cohen rapporta la differenza tra la proporzione di accordo osservata (p_o = esiti coincidenti / esiti totali) e la proporzione di accordo attesa (p_e = esiti coincidenti attesi / esiti totali) alla proporzione di non accordo attesa (ottenuta sottraendo a 1 la proporzione di accordo attesa). (6)
In simboli:

$$k = p_o - p_e / 1 - p_e$$

Per ottenere una interpretazione univoca e adimensionale di K come stima di Accordo o Riproducibilità, sono state utilizzate due griglie di valutazione.
La prima, più dettagliata, è stata proposta da J. Richard Landis e Gary G. Koch nel 1977, la seconda è stata proposta da Joseph L. Fleiss nel 1981: entrambe sono riportate nella tabella n.1.(6)
E' stata valutata la significatività del K attraverso il test Z. (6)

Tabella n.1 – Griglie di valutazione del K

Landis&Koch			Fleiss	
Kappa	**Agreement**		**Kappa**	**Reproducibility**
<0,00	Poor		>0,75	Excellent
0,00-0,20	Slight		0,40≤k≤0.75	Good
0.21-0.40	Fair		0.00 ≤k<0.40	Marginal
0.41-0.60	Moderate			
0.61-0.80	Substantial			
0.81-1.00	Almost perfect			

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati esaminati complessivamente 235 campioni, nel periodo di tempo compreso fra luglio 2008 maggio 2009.
Nella tabella n.2 sono riassunti i risultati delle analisi effettuate con i due metodi di prova.

Tabella n.2 – Risultati delle ricerche Salmonella spp. effettuate in parallelo con i due metodi

	ISO 6579:2002	**ISO 6579:2002/ Amd.1:2007**
POSITIVI	66 (28,1%)	71 (30,2%)
NEGATIVI	169 (71,9%)	164 (69,8%)
TOTALE	235 (100,0%)	235 (100,0%)

Sono risultati positivi con il metodo di riferimento 66 campioni su 235 (28,1%), mentre con il metodo alternativo ISO 6579:2002/ Amd.1:2007 sono risultati positivi 71 campioni su 235 (30,2%).
I risultati ottenuti sono stati inseriti in una tabella a doppia entrata ed utilizzati per la valutazione statistica (tabella n.3).

Tabella n.3 – Distribuzione dei risultati delle ricerche Salmonella spp. effettuate in parallelo con i due metodi

		ISO 6579:2002		Totale
		+	-	
ISO 6579:2002 Amd. 1:2007	+	65	6	71
	-	1	163	164
Totale		66	169	235

I risultati delle determinazioni effettuate con i due metodi di prova risultano concordanti in 228 campioni dei 235 esaminati.
Il Kappa di Cohen calcolato è pari a k =0,93 (IC 95%: 0,88 – 0,98). Questo valore è indice di buon accordo tra i due metodi (*excellent* secondo la scala di Fleiss, *almost perfect* secondo la scala di Landis e Koch). Il livello di accordo risulta inoltre statisticamente significativo (Z=11,94 ; p<0,001).
I risultati ottenuti da queste prove non consentono di rilevare differenze significative fra i due metodi di prova utilizzati, anche se la tendenza che si è manifestata è quella di rilevare un maggior numero di campioni positivi con il metodo di prova ISO 6579:2002/Amd 1:2007.
Si conferma comunque la validità del terreno MRSV nel selezionare *Salmonella* rispetto ai terreni Rvs e MKTTn (3); l' efficacia della capacità selettiva del MSRV, basata sulla abilità delle Salmonelle a migrare attraverso il terreno semisolido, è evidenziata dalla crescita in coltura pura delle presunte Salmonelle sui terreni solidi selettivi XLD e BGA che ne derivano; nei terreni solidi inoculati con i terreni di arricchimento Rvs e MKTTn si sviluppa in genere una flora batterica polimorfa all'interno della quale deve essere selezionato il microrganismo target. La tendenza ad una maggiore frequenza negli isolamenti di *Salmonella* spp. da parte del metodo ISO 6579:2002/Amd 1:2007 potrebbe diventare significativa incrementando il numero dei campioni esaminati e quindi il numero di isolamenti di *Salmonella* spp.
Il metodo ISO 6579:2002/Amd 1:2007 consente inoltre risparmio di tempi e terreni. D'altra parte consente di rilevare solo i ceppi di *Salmonella* spp. mobili.
Si ritiene che questo metodo possa essere vantaggioso per l'analisi di matrici che non rientrano formalmente nel suo campo di applicazione ma alle quali possano essere confrontate per quanto riguarda il livello di contaminazione, tenendo comunque presente il limite intrinseco di non consentire la rilevazione delle salmonelle non mobili.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1- Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.. Amendment 1: Annex D: Detection of Salmonella spp. In animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. ISO 6579:2002/Amd.1:2007.

2- Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.. ISO 6579:2002

3-Koyuncu, S., Haggblom, P., A comparative study of cultural methods for the detection of Salmonella in feed and feed ingredients. BMC Veterinary Research (2009), 5:6

4- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

5-Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in turkey flocks, Part B, The EFSA Journal (2008) 198, 1-224.

6-Soliani L., Manuale di statistica per la ricerca e la professione, Uni.Nova Parma (2006).

7-Worcman-Barninka, D., Destro, M.T., Fernandes, S.A., Landgraf, M., Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods. Int. J. Food Microbiol. (2001) 64, 387-393.

E' ANCOR POSSIBILE DIRE QUALCOSA DI NUOVO SUL CANE CON PIODERMITE?

[1]Beghelli D., [2]Moscati L.,[3]Malavolta M., [1] de Cosmo A.M,. [3]Piacenza F., [2]Battistacci L, [3]Mocchegiani E.

[1] Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Camerino, Matelica (MC); .[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia; [3]I.N.R.C.A., Ancona

Key words: dog pyoderma, trace minerals; immune responses.

SUMMARY – Aim of this study was to contribute to the understanding of the dog pyoderma pathogenesis. Some innate immune responses (complement's titration and serum bactericidial activity) and some serum trace mineral levels have been evaluated in dogs with pyoderma *vs* control ones. The results have highlighted a significant lower serum Zn concentration in dogs with pyoderma (671 *vs* 952).

INTRODUZIONE – Le piodermiti sono infezioni comuni del cane che comprendono un insieme di malattie, a diversa espressione clinica, sostenute da batteri piogeni capaci di interessare l'epidermide, il derma o l'ipoderma (1). A tutt'oggi, i fattori che ne determinano l'insorgenza sono molto dibattuti e, in parte, oscuri. Nella maggior parte dei casi, comunque, la piodermite non è una malattia primaria; ma una possibile complicazione di: allergie, endocrinopatie, immunodeficienze, infestazioni da ectoparassiti, displasia follicolare e predisposizione di razza (Lloyd, 2006). Il ruolo svolto dal sistema immunitario in corso di piodermite è stato oggetto di numerosi studi e ciò, probabilmente, proprio a seguito dell'ipotesi avanzata dal ricercatore Mason I.S. (3) sulla probabile esistenza di un difetto immunologico quale causa sottostante la piodermite del cane. In un nostro precedente lavoro era già stata evidenziata una diversa risposta del sistema del complemento (4). In questo studio si è cercato di apportare un ulteriore contributo alla comprensione della patogenesi della piodermite del cane cercando di mettere in correlazione la funzionalità del sistema immunitario innato (battericidia ed attività del complemento) con lo stato di alcuni microelementi (zinco-Zn, selenio-Se, ferro-Fe e rame-Cu) ed enzimi antiossidanti (glutatione perossidasi-GSH-pX).

MATERIALI E METODI – Gli animali (n. 15 cani con piodermite-**GP** e n. 15 cani di controllo-**GC**), di proprietà privata, provenivano tutti dalla provincia di Ancona e sono diventati oggetto dello studio previo consenso dei proprietari. Al momento della visita clinica, è stato effettuato il segnalamento ed è stata raccolta una anamnesi accurata. I cani, per venire inseriti nella sperimentazione, non dovevano essere stati sottoposti ad alcuna terapia da almeno 2 mesi. Solo nei soggetti patologici, è stato effettuato un esame colturale con il materiale prelevato sterilmente dalle lesioni cutanee e l'esame ha permesso l'isolamento di S.*intermedius* in coltura pura. Da ogni animale sono stati prelevati campioni di sangue in provette vacutainer con (litio-eparina) e senza anticoagulante. Le aliquote di sangue in toto (con anticoagulante) sono state impiegate per la determinazione dell'attività di glutatione perossidasi (kit Ransel n.505, Randox Laboratories, Crumlin, U.K. ed analizzatore automatico Hitachi 704) e per la determinazione della concentrazione emoglobinica (contaglobuli Haemat 8, SEAC). Le aliquote di siero, invece, sono state impiegate per determinare: l'attività battericidica e la titolazione del complemento (4, 5); la concentrazione delle proteine totali e relativo tracciato elettroforetico, nonché le concentrazioni di Zn, Se, Fe e Cu. Per la determinazione di queste ultime è stata impiegata una metodica simile a quanto riportato in bibliografia (6), in breve: i sieri sono stati dapprima centrifugati a 20000g per 5 minuti, successivamente il surnatante è stato diluito (1:10) con una soluzione tampone contenente 0,1%Triton e 1% di HNO3. La determinazione è stata, quindi, effettuata con un ICP-MS equipaggiato di camera di nebulizzazione del tipo Cynabar Ciclonic (Glass Expansion, Melbourne, AU), un sistema di raffreddamento Peltier ed una lampada al quarzo (1,5 mm) abbinata a nebulizzatore Burgener (Burgener Research International, England, 170U.K.). Una soluzione di rodio (Rh) a concentrazione di 10 µg/L è stata, infine, impiegata come standard interno dello strumento. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza con pacchetto statistico SPSS.

RISULTATI E DISCUSSIONE – Nella tabella n.1 vengono riportati i valori medi dei parametri considerati nei due gruppi di cani (**GP** *vs* **GC**).

Parametri		*GC*	*GP*	*P*
Fe ppm	***Media E S***	***3104 159***	***2665 306***	***n.s.***
Cu ppm	***Media E S***	***511 30***	***637 48***	***n.s***
Zn ppm	***Media E S***	***952 178***	***671 43***	***0.05***
Se ppm	***Media E S***	***342 23***	***303 14***	***n.s***
Cu/Zn	***Media E S***	***0.6 0.08***	***1.03 0.14***	***0.059***
GSH-pX U/gHb	***Media E S***	***278 34***	***310 23***	***n.s.***
Battericidia %	***Media E S***	***45 6***	***33 4***	***n.s***
Complemento CH50	***Media E S***	***45 7***	***32 9***	***n.s***
Albumina g/L	***Media E S***	***45 1.7***	***42 1.8***	***n.s***
Alfa globulina g/L	***Media E S***	***9.6 0.5***	***9.2 0.5***	***n.s***
Beta-globuline g/L	***Media E S***	***18 0.8***	***20 2.2***	***n.s***
Gamma-globuline g/L	***Media E S***	***6.6 0.7***	***5.9 1.5***	***n.s***
Proteine tot. g/L	***Media E S***	***79.6 2.3***	***76.5 3.0***	***n.s***

I risultati relativi al sistema immunitario innato, sebbene mostrino risposte migliori negli animali del **GC**, non evidenziano variazioni significative e ciò, nel caso della valutazione del complemento, è in contrasto con quanto

riportato precedentemente in bibliografia (4). Negli animali del **GP** si possono, inoltre, osservare concentrazioni inferiori di Zn (**GC >GP**; P≤0.05), Fe ed albumina rispetto al **GC**; mentre il Cu è l'unico parametro a presentarsi più elevato nel **GP**. Quest'ultimo dato spiega anche il valore del rapporto Cu/Zn nel **GP** pari a quasi il doppio di quello del **GC** (1.03 vs 0.6; P≤0.059).

La piodermite è, indubbiamente, una patologia della cute caratterizzata dalla presenza di un processo infiammatorio ed è ormai noto da tempo che, in corso di infiammazione, le "Proteine di Fase Acuta", possono subire delle oscillazioni, sia in senso positivo (aumento) che negativo (diminuzione). Tra le prime, rientra la ceruloplasmina, che a sua volta è responsabile del trasporto di circa il 93% del Cu sierico (per cui aumentando la sua concentrazione sierica aumenta anche il contenuto sierico di Cu) (7); tra le seconde, invece, rientra l'albumina. Generalmente, durante un processo infiammatorio, diminuiscono anche le concentrazioni di Zn e Fe: il primo, perché aumenta la sintesi epatica di una metallotionina che lega questo microelemento in un distretto diverso dal plasma; il secondo, perché avviene una sua ridistribuzione nell'organismo che lo devia dal circolo ematico ai tessuti (8). Quanto si osserva in questi due gruppi di animali sembrerebbe, pertanto, trovare piena giustificazione nella risposta infiammatoria che caratterizza la presenza o meno di piodermite negli animali.

Non bisogna dimenticare, però, che lo Zn ed il Cu, partecipando a diversi processi biochimici ed immunologici, giocano un ruolo importante nelle funzioni fisiologiche dell'organismo. Entrambi questi microelementi sono importanti nel catabolizzare i radicali liberi, servono a costruire la struttura dell'enzima citocromo ossidasi, funzionano da cofattori dell'enzima superossidodismutasi. Lo Zn in particolare sembrerebbe, inoltre, giocare un ruolo essenziale nella sintesi degli acidi nucleici e nello stabilizzare le membrane cellulari; nonché nell'aumentare la risposta immunitaria cellulare e le difese nei confronti di infezioni e neoplasie (8). Il fatto, pertanto, che in questo studio si sia riscontrata esclusivamente una concentrazione di Zn significativamente inferiore negli animali con piodermite è un dato che potrebbe anche venire spiegato non come una conseguenza della presenza di un processo infiammatorio, ma anzi come una causa che può aver predisposto all'insorgenza di un processo infettivo della cute.

Per quanto riguarda, infine, la concentrazione di Se ed attività dell'enzima ad esso strettamente correlato: glutatione perossidasi, si può rilevare che nei cani **GC***,* a fronte di valori leggermente superiori di Se corrisponde una minor attività dell'enzima; mentre, nei cani **GP,** si verifica l'esatto opposto. L'attività dell'enzima glutatione perossidasi (enzima facente parte dei meccanismi antiossidanti) è stata valutata in questo studio in quanto si voleva verificare se questo tipo di dermatopatia era in grado di indurre un aumento della produzione epatica di questo enzima, in risposta ad un potenziale stress ossidativo. Con il temine di stress ossidativo si intende uno squilibrio tra i meccanismi ossidanti-antiossidanti cellulari (9). I granulociti neutrofili, attivati dal contatto con le particelle opsonizzate, producono una grande quantità di perossido di idrogeno (H_2O_2) e questo se, da un lato, è una delle molecole chiave per l'uccisone dei batteri (potente azione battericida), dall'altro, è un composto molto tossico e chimicamente reattivo che, prodotto in eccesso (reazione infiammatoria intensa) o prodotto in soggetti con meccanismi antiossidanti inadeguati, può portare a stress ossidativo (anche localmente). Il germe Staphylococcus *intermedius* rappresenta un antigene senza dubbio in grado di attivare l'esplosione ossidativa dei granulociti neutrofili (Dzhelebov et al., 2006). Le medie di GSHpX riscontrate in questo lavoro, tuttavia, non hanno messo in evidenza differenze significative tra i due gruppi di animali ne stati carenziali di selenio.

In conclusione, questo studio ha messo in evidenza una significativa ridotta concentrazione di Zn nel gruppo di cani con piodermite rispetto al gruppo di controllo.

Vista la scarsità di informazioni reperibili, in bibliografia, sull'argomento per questa specie animale, è risultato impossibile confrontare questi dati con quelli di altri Autori. Questo risultato, a nostro avviso promettente, necessita a questo punto di un ampliamento della casistica che forse ci aiuterà a capire meglio il potenziale ruolo patogenico della carenza di Zn nell'insorgenza della piodermite del cane.

BIBLIOGRAFIA

(1) Fabbrini F. (2005) Piodermiti: classificazione, iter diagnostico e protocolli terapeutici. Atti del 50° Congresso Nazionale SCIVAC, Rimini, Italia, 27-29 Maggio: 103-107.

(**2**) Lloyd D.H. (2006d). Update on therapy of canine pyoderma. Proceedings of 31st World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, Prague, Czech Republic, 11-14 October:211-214.

(**3**) Mason I.S. (1991). Canine pyoderma. J.Small Anim. Pract. 32. pp: 381-386.

(**4**) Beghelli D., Moscati L., de Cosmo A, Pandolfi C. (2007) In: Atti SISVet LV, 187-188.

(**5**) Moscati L., Mancini S., Beghelli D., Urbani F., Battistacci L. (2006) Atti VIII Congresso Nazionele SIDILV, 181-182.

(**6**) Mestek O, Suchànek M., Vadicikovà Z., Zemanovà B., Zima T. (1997) Comparison of the suitability of various atomic spectroscopic techniques for the determination of selenium in human whoole blood. J. Anal Atom Spectrometry 12: 85-87.

(**7**) Brodzki A. (2007) Bull Vet Inst Pulawy 51, 271-273.

(**8**) Kushner I., (1982) The phenomenon of the acute phase response. Annals New York Academy of Sciences. 39-48.

(**9**) Sies, H**.** (1991). Oxidative Stress: Introduction. In: H. Sies (ed.) Oxidative Stress. Academic Press, London, U.K. p. 15-22.

(**10**) Dzhelebov P. V., Andonova M. J., Urumova V. S., Slavov E. P. (2006) Hydrogen peroxide production of neutrophils during staphylococcal infection in obese dogs. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine (2006) 9, No 3, 183−188.

INDICATORI FECALI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA: STUDIO PRELIMINARE CONDOTTO SU ALLEVAMENTI SUINI PIEMONTESI

Bergagna S.[1], Zoppi S.[1], Rossi F.[1], Adriano D.[1], Traversa A.[1], Careddu M.E.[1], Vitale N.[2], Chiavacci L.[2], Dondo A.[2]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta;

[2]Osservatorio Epidemiologico Regionale, Torino

Keywords: antimicrobial resistance – *Enterococcus spp.* – *E. coli* – swine faeces

INTRODUZIONE

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza ha assunto, nel corso degli ultimi decenni, sempre più importanza a livello nazionale ed internazionale (1).

Infatti, l'uso di antimicrobici a scopo terapeutico e come promotori di crescita, ha esercitato una pressione selettiva tale da determinare la comparsa di ceppi batterici resistenti a molti dei più comuni antibiotici usati nella pratica clinica.

Il presente studio si propone di riportare i dati ottenuti dall'analisi della resistenza agli antibiotici in batteri commensali o indicatori, isolati da campioni di feci prelevati in allevamenti suini piemontesi.

E. coli e *Enterococcus* spp. sono batteri commensali dell'intestino umano e degli animali, pertanto hanno caratteristiche idonee a fungere da microrganismi indicatori degli effetti della pressione selettiva esercitata sulle popolazioni batteriche dall'uso degli antibiotici sia per scopi terapeutici che per scopi di promotori di crescita. Inoltre, rivestono notevole importanza come potenziale serbatoio di determinanti genetici di resistenza in grado di essere trasferiti ad altri batteri patogeni (2,3,4,5).

L'allevamento suino è considerato inoltre una delle fonti principali di diffusione di agenti zoonosici trasmissibili all'uomo attraverso gli alimenti lungo tutta la filiera produttiva.

Per questo scopo, *E. coli* quale indicatore tra i batteri Gram negativi ed *Enterococcus faecium* e *faecalis* per i batteri Gram positivi sono stati oggetto di indagine per la valutazione della pressione selettiva esercitata da alcuni antibiotici su questi microrganismi (7).

MATERIALI E METODI

In questo studio l'unità epidemiologica di riferimento è rappresentata dall'allevamento suino da riproduzione. E' stata scelta la provincia di Cuneo dove sono localizzati 233 allevamenti da riproduzione (dati anagrafe suina al 31/12/2007). Poiché la popolazione di studio è di dimensioni finite, si è utilizzata la formula che corregge le popolazioni finite per calcolare la dimensione campionaria appropriata. Si è convenuto che per stimare il fenomeno ipotizzando una prevalenza del 20% (IC 95% errore 17%) il numero degli allevamenti da campionare risulta essere di n=19. Inoltre, ipotizzando all'interno dell'allevamento una prevalenza del 10% (IC 95% errore 5%) il numero dei campioni da analizzare per allevamento è di n=30.

In ogni allevamento sono stati effettuati n=3 campioni di feci in pool di 10 animali. All'arrivo nel Laboratorio di Patologia Animale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino, i 3 campioni (corrispondenti a 30 capi per allevamento) sono stati analizzati per la ricerca di germi indicatori di antibiotico resistenza.

Dal campione di feci è stato prelevato 1 g di materiale e stemperato e in seguito omogeneizzato in 10 ml di Buffered Peptone Water (BPW).

E.coli – il campione è stato seminato con un tampone sterile su una piastra di Agar McConkey. In seguito ad incubazione a 37°C per 24 ore, le colonie di grosse dimensioni di colore rosso-fucsia lattosio-fermentanti (viraggio del terreno al fucsia) cresciute sul terreno Agar McConkey sono state trapiantate su una piastra di Agar McConkey e su brodo triptone rispettivamente incubati a 42°C e a 37°C per 12-18 ore.

Il giorno successivo è stata valutata la crescita sulle piastre di Agar McConkey e la produzione di indolo nella sospensione in brodo triptone aggiungendo due gocce di reattivo di Kovac e osservando la formazione di un anello fucsia sulla superficie del terreno. In caso di positività a queste prove (crescita a 42°C e produzione di indolo), il campione è stato considerato positivo per *E. coli*.

***Enterococcus* spp.** – Il campione in BPW è stato seminato con tampone sterile su una piastra di Slanetz Bartey Agar (SBA). L'incubazione è avvenuta in termostato a 42°C per 48 ore.

Le colonie piatte e mucoidi, di 1-2 mm di diametro a margini regolari, generalmente circondate da un'area di β-emolisi, sono state trapiantate su Agar Sangue e incubate per 16-18 ore a 37°C. Successivamente i ceppi isolati sono stati sottoposti ad identificazione batterica.

Antibiogramma – Sui ceppi isolati ed identificati, è stato eseguito l'antibiogramma parallelamente sia con il metodo degli aloni di inibizione di Kirby-Bauer sia con il metodo della minima concentrazione inibente (MIC) utilizzando, per tale scopo, le strip antibiotate in commercio (Oxoid).

Le molecole antibiotate utilizzate per *E. coli* sono state il cefotaxime in dischetti antibiotati da 30 µg e strip con concentrazioni scalari di principio attivo da 256µg/ml a 0.015 µg/ml (break-point 1 µg/ml).

Per i ceppi di *E. faecium* e *faecalis* sono stati utilizzati i dischetti di gentamicina da 120 mg, di streptomicina da 300 mg e le strip di vancomicina con concentrazioni scalari di principio attivo da 256µg/ml a 0.016 µg/ml (break-point 6 µg/ml), in accordo alle norme CLSI.

Analisi statistica – L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software S.A.S v.8.2 (6).

RISULTATI

Nella fase preliminare del presente lavoro, sono pervenute ad oggi al Laboratorio le feci appartenenti a n. 17 allevamenti suini (dei 19 selezionati).

Complessivamente sono stati analizzati 51 campioni di feci, corrispondenti a 1530 animali. *E. coli* è stato isolato in tutti gli allevamenti campionati.

Sono stati isolati ed identificati 51 ceppi di *E. coli* di cui il 59% è risultato sensibile alla cefotaxime e il 41% resistenti, utilizzando il metodo Kirby-Bauer. La percentuale di resistenza scende a 2% testando i ceppi con il metodo delle MIC (n. 1 ceppo).

Analogo dato di resistenza al cefotaxime emerge comparando il risultato ottenuto sui ceppi con l'allevamento di origine (confermando la presenza di positività di n. 1 allevamento su 17 testati).

Enterococcus spp. è stato isolato in n. 13 dei 17 allevamenti campionati. Sono stati isolati complessivamente n. 29 ceppi, di cui n. 7 identificati come *E. faecalis* e n. 22 come *E. faecium.*

Complessivamente tutti i ceppi testati sono risultati sensibili alla gentamicina, mentre sono state rilevate resistenze nei confronti della streptomicina (*E. faecium*: n. 6 ceppi resistenti e n. 16 sensibili; *E. faecalis*: n. 3 ceppi resistenti, n. 2 intermedi, n. 2 sensibili).

Inoltre, è stata messa in evidenza la distribuzione della

resistenza nei confronti della streptomicina in relazione al ceppo isolato. Si è osservato una percentuale di resistenza pari al 43% dei ceppi di *E. faecalis* rispetto al 27% osservato sui ceppi di *E. faecium*. Testando i ceppi isolati con il metodo delle MIC è emerso che il 14% dei ceppi di *E. faecalis* e il 5% di *E. faecium* è resistente alla vancomicina.
Traslando il dato sull'allevamento di origine, si osserva che sul 41% degli allevamenti è stato identificato almeno un ceppo di *Enterococcus* spp. resistente a streptomicina e del 12% resistente alla vancomicina. Da n. 1 allevamento è stato isolato un ceppo resistente sia alla streptomicina che alla vancomicina.
È' stata indagata la presenza di una possibile correlazione tra i due patogeni isolati all'interno dello stesso allevamento. Dall'analisi eseguita è emerso che i dati non sono statisticamente significativi ($\chi2$= 3.14 p=0,21). Non è presente quindi una correlazione tra la presenza di *E. coli* ed *Enterococcus* spp.
All'interno dello stesso allevamento, sono stati successivamente messi in correlazione i ceppi di *E. coli* resistenti al cefotaxime con i ceppi di *Enterococcus* spp. resistenti alla streptomicina. Non sono stati inseriti i dati relativi alla gentamicina in quanto tutti gli enterococchi isolati sono risultati essere sensibili a tale molecola.
Dall'analisi statistica eseguita, tra i ceppi di *E. coli* e di *Enterococcus* spp. resistenti non esiste correlazione statisticamente significativa all'interno dello stesso allevamento ($\chi2$= 1.43 p=0,23; test esatto di Fischer p=0,33), mentre è presente un'associazione statisticamente significativa quando si analizzano gli stessi risultati rapportandoli ai 52 campioni fecali ($\chi2$= 4.34 p=0,037) indipendentemente dall'allevamento di origine.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, a fronte di un utilizzo estensivo degli antibiotici in medicina veterinaria, anche con molecole di classe o struttura analoghe a quelle usate in medicina umana, si è assistito all'emergenza di fenomeni di resistenza in batteri commensali, patogeni e talvolta in agenti di malattia trasmissibile con gli alimenti (MTA).
Sulla base di questo presupposto, lo studio del pattern di resistenza dei microrganismi ubiquitari, quali ad esempio le *Enterobacteriaceae*, usati come indice per la valutazione dell'igiene di processo di un prodotto alimentare ai sensi dei regolamenti comunitari, può fornire indicazioni in merito alla presenza di determinati geni di resistenza circolanti nelle popolazioni animali e trasferibili, pertanto, lungo la filiera zootecnica al consumatore finale, cioè l'uomo. Conseguentemente, analizzando i risultati ottenuti nel nostro studio, degno di nota è il dato relativo alla presenza di resistenza a cefotaxime sui ceppi di *E. coli* testati. Questo dato risulta essere di consistenza maggiore rispetto a quanto emerso dal Primo Report sull'antibiotico-resistenza ITAVARM 2003, dove la resistenza a tale molecola risultava inferiore al 5% nel pollo e ancora più bassa nelle altre specie, compreso il suino.
Questo dato trae origine probabilmente sia dal diverso contesto geografico considerato (dati nazionali raccolti in varie regioni italiane confrontati con dati raccolti da una popolazione a livello provinciale) sia dalla tipologia del campionamento (dati nazionali relativi a diverse specie zootecniche confrontati con quelli raccolti esclusivamente su suini da riproduzione). Bisogna inoltre sottolineare che si tratta di uno screening preliminare che necessita di ulteriori prove di conferma su base genotipica al fine di stabilire se effettivamente ci si trova di fronte a ceppi che presentano spettri estesi di resistenza ai beta-lattamici (ESBL).
Per quanto riguarda i ceppi di *Enterococcus* spp., rispetto al report 2003 dove la resistenza alla streptomicina risultava essere pari al 50% degli isolati nel suino, nel nostro studio preliminare risulta essere del 31%, pertanto in linea con quanto osservato a livello nazionale.
Considerando l'importanza che riveste in medicina umana la resistenza agli aminoglicosidi, elevata sia per quanto riguarda la streptomicina (72.6% in *E. faecium* e 31.6% in *E. faecalis*) che per la gentamicina (38.6% in *E. faecium* e 37.5% in *E. faecalis*), risulta di interesse comunitario investigare la comparsa di antibioticoresistenza nei germi indicatori fecali.
Rispetto ad altri studi condotti a livello nazionale dove non si rilevava resistenza alla vancomicina nella specie suina, nella nostra indagine veniva riscontrata su n. 2 ceppi (14%).
Per quanto concerne *E. faecium* emerge un dato concorde rispetto a quanto evidenziato da altri lavori scientifici italiani.
Importante risulta essere il ruolo di questa attività di sorveglianza mirata alla tutela della salute pubblica.
Pertanto, ci si propone, per il futuro, in armonizzazione con il Centro di Referenza per l'Antibioticoresistenza, di implementare lo studio svolto finora sui germi indicatori, tenendo conto della complessità dei fattori di rischio in campo e esteso ad altre specie animali e raccogliendo eventualmente dati anamnestici relativi ai trattamenti farmacologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Bywater J.R., Casewell M.W., 2000. An assessment of the impact of antibiotic resistence in different bacterial species and of the contribution of animal sources to resistance in human infection. Journal of antimicrobial chemotherapy, 46, 639-645.
2. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall CG., 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microb. Rev. , 686-707.
3. Figarolli B.M., Ossiprandi M.C., 2006. Ceppi antibiotico-resistenti di Enterococcus. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma, vol. XXVI, 219-234.
4. Hershberger E., Oprea SF., Donabedian SM., Perri M., Bozigar P., Bartlett P., Zervos MJ., 2005. Epidemiology of antimicrobical resistance in enterococci of animal origin. J. Antimicrob. Chemother. 55, 127-130.
5. L.S.Chavers, S.A. Moser, W.H. Benjamin, L.R.Steinhauer, A.M. Smith, C.N. Johnson, E. Funkhouser, L.P. Chavers, A.M Stamm and K.B. Waites: Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. Journal of hospital Infection 2003, 53: 159-171.
6. Stockes M.E. et al. 2000 – Categorical Data Analysis Using The SAS System 2nd Edition.
7. Van den Bogaard AE., Stobberingh EE., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int. J. Antimicrob. Agents 14 (4), 237-335.

ABSTRACT

Antibiotic-resistance can be defined as the ability of bacteria to grow in presence of high concentrations of antimicrobics or to withstand an antibiotic to which they were once sensitive. This represents an important issue both in public health and in veterinary medicine. This study contains data about the detection of antibiotic-resistant strains in swine faecal samples, recognized in *E. coli* and *Enterococcus* spp., natural inhabitants of intestinal mucosa in mammals and birds.

STUDIO PRELIMINARE PER LA VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE DI UN TEST IMMUNOCROMATOGRAFICO PER LA DIAGNOSI IN VITA DI TUBERCOLOSI BOVINA

Bergagna S.[1], **Zoppi S.**[1], **Ippolito C.**[1], **Rossi F.**[1], **Vitale N.**[2], **Chiavacci L.**[2], **Bertoli M.**[3], **Dondo A.**[1]
[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*
[2] *Osservatorio Epidemiologico Regionale, Torino*
[3]*Promevet s.r.l., Milano*

Keywords: bovine tuberculosis – immunochromatographic assay- cattle

INTRODUZIONE

La tubercolosi bovina (bTB) è una patologia complessa sia nella patogenesi che nella diagnosi *in vita*. Pertanto, si possono ancora trovare in bibliografia molti studi condotti per affinare i metodi diagnostici già a disposizione e per mettere a punto nuovi test (3,7).
I test *in vita*, a partire dalla prova della tubercolina, si basano principalmente sul rilievo della immunità cellulo-mediata, in quanto la risposta immunitaria predominante nell'infezione tubercolare è di tipo cellulare, piuttosto che umorale. Sono stati studiati anche test immunoenzimatici (1) basati sulla rilevazione della risposta umorale, ma non hanno mai trovato un ampio impiego nella diagnostica della bTB.
Tuttavia, grazie al sequenziamento del genoma di *M. bovis* (2), si è riusciti ad individuare gli antigeni in grado di evocare nell'ospite una risposta umorale nelle fasi avanzate dell'infezione e le nuove tecniche di ingegneria genetica sono state in grado di sintetizzarli. Nell'ottica di aumentare la sensibilità diagnostica (8), le nuove tecniche sierologiche infatti si avvalgono dell'utilizzo di questi antigeni ricombinanti, quali ad esempio MBP83 e MPB70,
In queste fasi finali dell'eradicazione è inoltre indispensabile poter usufruire di test *in vita* che riescano a svelare il numero maggiore di capi infetti. L'utilizzo del gamma interferon test come prova ancillare all'intradermoreazione, dimostra come test differenti aumentino la sensibilità diagnostica, svelando più precocemente l'infezione e di conseguenza abbiano contribuito ad accelerare il processo di eradicazione della bTB.
Scopo del presente studio è pertanto quello di valutare un test rapido immunocromatografico (ICT) già disponibile in commercio che potrebbe rappresentare un utile strumento nella diagnosi *in vita* della bTB.

MATERIALI E METODI

Per la valutazione delle performance del test ICT sono stati processati complessivamente n. 133 sieri e in particolare, per la valutazione della specificità sono stati considerati n. 57 sieri provenienti da allevamenti piemontesi siti nelle province di Novara e di Verbania indenni dal 2007 per tubercolosi bovina (campioni veri negativi) e per la valutazione della sensibilità i sieri dei capi che avevano presentato o lesioni riferibili a tubercolosi bovina e/o positività all'esame colturale. Con tali requisiti sono stati selezionati complessivamente n. 76 sieri appartenenti all'allevamento sede di focolaio (campioni veri positivi).
Inoltre, avendo a disposizione il risultato del gamma interferon test su n. 140 campioni provenienti da un focolaio, è stato calcolato su questi campioni, l'indice di concordanza tra il test ICT e il γ-IFN test.
Per valutare la correlazione fra lesioni anatomo-patologiche e risposta umorale, è stato calcolato l'indice di concordanza tra il test ICT e la presenza di lesioni all'esame anatomo-patologico su n. 59 campioni con lesioni riferibili a bTB.
Infine, è stato valutata la sensibilità di tubercolina, γ-interferon test e ICT, in singolo e in parallelo utilizzando il campione di animali veri positivi (n=76).
I sieri selezionati sono stati saggiati con un test rapido immunocromatografico secondo il protocollo fornito dalla Ditta produttrice.
L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software S.A.S v.8.2 (5).

RISULTATI

Dei n. 57 sieri provenienti da allevamenti ufficialmente indenni da bTB, campioni veri negativi, n. 2 sono risultati positivi al test ICT e n. 55 negativi.
Su n. 76 campioni veri positivi, n. 21 sieri hanno dato esito positivo e n. 55 esito negativo.
I risultati della valutazione delle performance del test ICT su tali campioni sono riassunti nella Tabella n. 1

Tabella n. 1: sensibilità (Se) e specificità (Sp) del test ICT

	TEST ICT
Se	**27.63% IC 95% (18%-39%)**
Sp	**96.49% IC 95% (88%- 99%)**

Il confronto tra i risultati ottenuti al test ICT e al γ-IFN test su n. 140 campioni sono riportati nella Tabella n. 2.

Tabella n. 2: confronto fra i risultati ottenuti con due differenti test (ICT e γ-IFN test)

ICT	**γ-IFN test**	
	NEG	**Positivo *M. bovis***
NEG	41	**69**
POS	7	**23**
TOT	**48**	**92**

*Tabella n. 3: confronto fra i valori di sensibilità (SE) ottenuti dai test utilizzati in singolo e in parallelo. * La prova tubercolinica è stata eseguita solo su n. 38 animali. Il numero di falsi negativi (FN)relativi alla tubercolina è stimato moltiplicando 1-la sensibilità della tubercolina (ottenuta su 38 campioni) per n. 74 campioni effettuati.*

TEST	**SE**	**IC 95%**	**FN**
prova tubercolinica	76,32%	(59,8%-88,6%)	18*
γ–IFN test	90,05%	(81,5%-96,1%)	7
tubercolina+γ–IFN test	91,90%	(83,2%-96,9%)	6
tubercolina+γINF test+ICT	94,60%	(86,7%-98,5%)	4

L'indice di concordanza per valutare il grado di accordo dei risultati ottenuti dai due test considerati ha dato i seguenti risultati: K=0.086 IC 95% (0.02-0.19).
Infine, l'indice di concordanza tra il test ICT e la presenza di lesioni all'esame anatomo-patologico calcolato su n. 59 campioni risultati essere n. 16 positivi e n. 43 negativi al test ICT, è pari a K=0.02 (0.12-0.18) e la Se=27.12 IC 95% (16-40).
L'utilizzo in parallelo dei tre test (tubercolina, ICT e il γ-IFN test) permette di elevare la sensibilità diagnostica al 94.6% (Tabella n. 3).

DISCUSSIONE

Sulla base dei risultati ottenuti la sensibilità del test ICT è pari al 27% e la specificità al 96%.
Il primo studio condotto in Canada su un allevamento infetto composto da 44 animali, ha mostrato una sensibilità più elevata, pari al 73%, e una specificità dell'88% (4), ma aumentando il numero degli animali testati, oltre 1000 campioni, questi valori passano al 18% per la sensibilità e al 96% per la specificità (9). Pertanto i valori ottenuti nel nostro studio si collocano nel range dei valori descritti in bibliografia. Infatti, il problema principale di questi test sierologici, data la buona specificità, sembra essere essenzialmente quello di non essere in grado di amplificare il segnale prodotto dalla risposta anticorpale (8).
Il test di K mostra totale indipendenza tra il test ICT e il γ-IFN test. Questo risultato è in linea con quanto atteso per le caratteristiche intrinseche di entrambi i test, in quanto uno si basa sull'immunità cellulo-mediata e l'altro sull'evidenziazione degli anticorpi. In accordo con quanto riportato in bibliografia (6), l'allevamento, oggetto di questo studio, potrebbe essersi infettato relativamente in tempi molto recenti e pertanto gli animali non erano ancora in grado di presentare una risposta umorale rilevabile. A conferma di questo, va ricordato che l'origine del focolaio è da ricercarsi nella presenza di un animale infetto rimasto in allevamento dopo un precedente risanamento parziale, che aveva coinvolto solo gli animali risultati positivi ai test, eseguito nel 2002-2003.
Pertanto, nella valutazione delle performance di questo test non deve essere dimenticata la complessità di questa patologia e soprattutto va ricordato che, in situazioni particolarmente gravi dove la bTB è ancora presente e la prevalenza è molto elevata, ma lo stamping out potrebbe essere un sistema troppo penalizzante per l'economia di un paese, il test ICT potrebbe essere utilizzato in associazione all'intradermoreazione e/o al gamma interferon test, qualora usato, per la rilevazione di infezioni ad uno stadio avanzato e, in questo modo, per eliminare dall'effettivo animali che non reagiscono più positivamente ai test che si basano sulla risposta cellulo-mediata, ma presentano livelli di anticorpi sufficientemente rilevabili.
Nel nostro studio, inoltre, si è osservata la presenza di un animale con lesioni riferibili a bTB, negativo al gamma interferon test e positivo all'ICT.
Pertanto, dai risultati ottenuti, si evidenzia come l'utilizzo in parallelo di più metodiche indipendenti tra loro, possa aumentare la sensibilità della diagnosi *in vita*, evidenziando animali falsamente negativi che potrebbero essere potenziali diffusori della patologia in periodi successivi.

BIBLIOGRAFIA

1. Cheong Koo H.,Ho Park Y.,Ahn J., Waters W.R., Palmer M.V., Hamilton M.J., Barrington J., Mosaad A.A., Park K.T., Jung W.K., Hwang I.Y., Cho S-N., Shin S.J. and Davis W.C., 2005. Use of rMPB70 Protein and ESAT-6 Peptide as Antigens for Comparison of the Enzyme-Linked Immunosorbent, Immunochromatographic, and Latex Bead Agglutination Assays for Serodiagnosis of Bovine Tuberculosis Journal of Clinical Microbiology 43(9): 4498–4506
2. Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V., and Hewinson R.G., 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. PNAS 100(13): 7877-7882.
3. Gormley E., Doyle M.B., McGill K., Costello E., Good M., Collins J.D., 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma- interferon assay for the detection of Mycobacterium bovis infection in cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology 102, 413-420.
4. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR et al., 1990;Protein G-based enzyme linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 28:913–21.
5. Stockes M.E. *et al.* 2000 – Categorical Data Analysis Using The SAS System 2nd Edition.
6. Vordermeier, M., Goodchild, A., Clifton-Hadley, R., de la Rua, R., 2004. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress.Veterinary Record 155, 37–38.
7. Waters W.R., Paler M.V., Thacker T.C., Bannantine J.P., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Greenwald R., Esfandiari J., McNair J., Pollock J.M., Andersen P., Lyashchenko K.P., 2006. Early antibody responses to experimental Mycobacterium bovis infection of cattle. Clinical and vaccine immunology 648-654.
8. Wiker H.G., 2009. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of *Mycobacterium bovis*. Scandinavian Journal of Immunology 69: 492–499
9. Wood PR, Corner LA, Rothel JS et al.,1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet Microbiol. 31:71–9.

ABSTRACT

This study evaluated the performance of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of bovine tuberculosis. This test is a chromatographic immunoassay for the qualitative detection of *Mycobacterium bovis* antibody in bovine plasma and serum. This test showed a lack of sensitivity (27.63% - IC 95%: 18%-39%) and a good level of specificity (96.49% - IC 95%: 88%- 99%). Cohen's K coefficient revealed a total independence between ICT and gamma interferon test. It could be used with the skin test to determine the status of disease and reduce the frequency of misdiagnosis of animals free of bTB

ANALISI DI PATERNITA'/MATERNITA' COME STRUMENTO DI CONTROLLO PER GLI ORGANI UFFICIALI DI VIGILANZA

Biagetti M.[1], Venditti G.[1], Sebastiani C.[1], Checcarelli S.[1], Ortenzi R.[1], Filippini G.[1], Mazzone P.[1], Medini D.[2], Boni M.[3], Farinelli M.[3], Todini V.[3]

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Perugia; 2 Novartis Vaccines and Diagnostics – Siena; 3 ASL2 - Perugia

Keywords: marcatori microsatelliti, DNA fingerprinting, analisi paternità/maternità

SUMMARY

In order to guarantee quality and safety of beef meat "Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche" (IZSUM) has applied "DNA fingerprinting" methodology to verify traceability and to assess paternity/maternity relationships among bovine individuals. The test is based on the comparison of the genetic profiles produced by the analysis of genomic polymorphisms, named microsatellites. For paternity analysis the alleged parent, to be considered the biological one, is required to share 50% of its genetic profile with the offspring. Here we report the results of paternity analysis that IZSUM has performed for an investigation of the Official Authority.

INTRODUZIONE

Al fine di aumentare la fiducia dei consumatori e di garantire la qualità e la sicurezza della carne bovina, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) ha applicato un metodo molecolare di analisi (1,5) finalizzato alla tracciabilità delle carni bovine (4) ed alle analisi di paternità/maternità nei bovini. L'identificazione esatta della paternità in soggetti che originano da accoppiamenti non controllati o da gruppi di monta con più riproduttori maschi rappresenta un potente mezzo per migliorare le capacità decisionali e gestionali degli allevatori. In aggiunta, i test di paternità basati sull'analisi del DNA consentono una verifica economica dei pedigree da parte delle associazioni di razza e si prestano ad essere utilizzati anche come strumento di controllo per gli organi ufficiali di vigilanza in caso di sospette azioni fraudolente. La procedura si basa sull'analisi di alcune zone altamente polimorfiche del genoma, i microsatelliti o STR (Short Tandem Repeats) (6). Analizzando più polimorfismi STR si produce un profilo genetico caratteristico di ogni individuo ("DNA Fingerprint"), cioè un'impronta digitale basata sulle caratteristiche del DNA. La metodica del "DNA fingerprinting" è già stata applicata con successo per analisi di paternità/maternità; questa si basa sul principio che ogni individuo eredita il 50% del proprio patrimonio genetico dalla madre ed il 50% dal padre. Il test consiste nel confronto del profilo genetico derivante dal figlio oggetto di indagine di paternità/maternità con i profili genetici derivanti dal padre e/o dalla madre presunta. Il presunto genitore per essere considerato il padre/madre biologica dovrà possedere metà del profilo genetico presente nel figlio. Nel presente lavoro vengono riportati i risultati dell'applicazione del DNA fingerprinting alle analisi di paternità che l'IZSUM ha eseguito nell'ambito di un'indagine condotta dagli organi ufficiali di vigilanza.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 318 campioni totali (sangue e carne) divisi in tre gruppi a seconda delle richieste e della provenienza:

- Gruppo 1: 43 vacche confrontate con 42 vitelli confronto a coppie (1 a 1);
- Gruppo 2: 117 vitelli confrontati con un gruppo di 77 vacche/tori (tutti contro tutti);
- Gruppo 3: 36 vitelli confrontati con 3 tori (tutti contro tutti).

I campioni di sangue dei vitelli e dei presunti genitori è stato prelevato in allevamento in provette di polipropilene contenenti EDTA e consegnato refrigerato a + 4°C in giornata o, altrimenti congelato a -20°C.

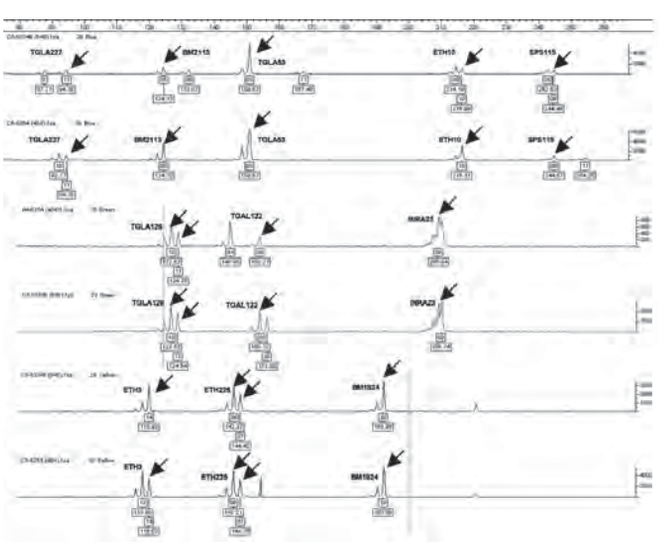
Dai campioni è stato estratto il DNA genomico secondo le istruzioni del kit "High Pure PCR Template Preparation kit (ROCHE). Il DNA estratto è stato quantizzato spettrofotometricamente ed amplificato in una unica reazione di PCR multiplex con 11 coppie di primers specifici per 11 loci STR raccomandati dall'ISAG per la loro informatività (Tab.1).

Tab. 1: Marcatori microsatelliti utilizzati per le analisi di paternità

Microsatellite	N° alleli	Temp. annealing	Range grandezza amplificato (bp)	Cromosoma
TGLA227	13	61°C	64-115	18
BM2113	11	61°C	116-146	2
TGLA53	7	61°C	147-197	16
ETH10	10	61°C	198-234	5
SP115	5	61°C	235-265	15
TGLA126	3	61°C	104-131	20
TGLA122	16	61°C	134-193	21
INRA23	12	61°C	193-235	3
ETH3	8	61°C	90-135	19
ETH225	10	61°C	135-165	9
BM1824	6	61°C	170-218	1

I frammenti di amplificazione sono stati analizzati impiegando lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I dati ottenuti sono stati elaborati mediante software dedicati (GENESCAN 2.0 e GENOTYPER 2.0) I profili genetici ottenuti sono stati messi a confronto.

Figura 1: Attribuzione di paternità/maternità: le frecce indicano gli alleli condivisi dai due campioni per ogni locus



RISULTATI E DISCUSSIONE

Per gli animali appartenenti al gruppo 1 sono state effettuate delle comparazioni madre-figlio a coppie secondo le segnalazioni degli organi di controllo. In questo gruppo sono state identificate 3 attribuzioni di paternità per le quali è stata calcolata la probabilità di paternità (2,3) sulla base delle frequenze alleliche relative ai campioni utilizzati per la validazione della metodica. Per il gruppo 2 sono state invece effettuate delle comparazioni del tipo "tutti contro tutti" tra un sottogruppo di 117 vitelli ed uno di 77 vacche/tori. Gli animali appartenenti a questo gruppo erano caratterizzati da un basso grado di variabilità genetica (presenza di un numero ristretto di varianti alleliche a livello di molti loci analizzati) probabile riflesso di un alto tasso di "inbreeding". Per alcuni animali sono stati identificati più possibili genitori. Al fine di svelare le eventuali relazioni di paternità o di maternità e di identificare il genitore più probabile tra più genitori possibili sono stati utilizzati due software di analisi. Innanzitutto per ogni STR analizzato è stata effettuata, con due sistemi indipendenti, una categorizzazione delle taglie alleliche sulla base della distribuzione delle varianti alleliche. Il primo software "home made", che fornisce in formato Excel i risultati delle comparazioni tra profili come numero di corrispondenze (match) di loci STR, è stato utilizzato per effettuare una selezione dei risultati individuando tutte le coppie di campioni con meno di 10 match STR, che sono stati refertati come "Esclusioni di Paternità", e per individuare le possibili attribuzioni di paternità tra le coppie di campioni con 10 e 11 match STR.

E' stato poi necessario utilizzare un software per analisi di popolazione (Cervus v.3.0) (7) per l'interpretazione di situazioni di ambiguità (campioni con match su 11 STR con più potenziali padri/madri oppure match su 10 STR). Le taglie alleliche, in questo caso, sono state approssimate a numeri interi sulla base della suddetta categorizzazione per poter essere utilizzati dal programma di analisi e la paternità è stata attribuita con un livello di confidenza prefissato generalmente al 99% o al 95%. In questo gruppo sono state evidenziate 4 attribuzioni di paternità con un livello di confidenza del 99% e 4 con un livello di confidenza del 95%. L'analisi di popolazione ha individuato altre 11 potenziali relazioni di paternità ma con un livello di confidenza molto più basso (≤ 80%).

Infine, i profili genetici dei 36 vitelli appartenenti al terzo gruppo sono stati comparati manualmente con quelli derivanti tra 3 tori presunti padri; non è stata riscontrata nessuna attribuzione di paternità in questo gruppo.

In quest'ottica, le analisi di genetica forense si sono rivelate di fondamentale importanza per la risoluzione delle indagini.

BIBLIOGRAFIA

1. Arana A., Soret B., Lasa I., Alfonso L., (2002). " Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry". Meat Science, 61: 367-373.

2. Dodds K. G., Tate M.L., Sise J.A. (2005). "Genetic evaluation using parentage information from genetic markers" Journal of Animal Science 83: 2271-2279

3. Marshall T.C., Slate J., Kruuk E.B., Pemberton J.M. (1998). "Statistical confidence for likelihood–based paternity inference in natural populations" Molecular Ecology 7: 639-655

4. Papa P., Biagetti M., Sebastiani C., Filippini G., Ciampolini R., Laudisio P., Ghiandoni S., Pezzotti G., Foglini A. (2004). "Short Tandem Repeats (STR) per verificare la tracciabilità delle carni bovine" Industrie Alimentari 434: 257-262

5. Sancristobal-Gaudy M., Renand G., Amigues Y., Boscher M.-Y., Levéziel H., Bibe B.. (2000). "Tracabilitè individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs génétiques" INRA Prod. Anim., 13 (4): 269.

6. Vaiman D., Mercier D, Moazami-Goudarzi K, Eggen A, Ciampolini R, Lépingle A, Velmala R, Kaukinen J, Varvio SL, Martin P, Levéziel H., Guérin G., (1994). "A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism" Mammalian Genome, 5: 288.

7. www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervus/(Cervus 3.0 – Cervus help)

CASEIFICAZIONI SPERIMENTALI PER IL CONTROLLO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE CEPPI LATTICI PRODUTTORI DI BATTERIOCINE

[1]Bianchi D.M., [1]Gallina S., [2]Corvonato R., [2]Radium P., [2]Brunetto T., [2]Fragassi S., [1]Decastelli L.

[1] NRL per gli Stafilococchi coagulasi positivi compreso S. aureus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

[2]S.C.Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Key words: *L.lactis. L.monocytogenes*, **bacteriocins**

SUMMARY

Lactococcus lactis is often isolated in fermented foods (e.g. cheese, sausage, fermented vegetables). Some strains of *L. lactis* can produce bacteriocins; one of those, nisin, is a polypeptide which is active especially against Gram-positive bacteria.

The aim of our study was to investigate the bacteriocins production from *L. lactis* strains isolated in traditional cheeses and their effectiveness *in vivo* against *L. monocytogenes* strains.

INTRODUZIONE

Gli alimenti fermentati rappresentano da sempre un alimento importante nella dieta dell'uomo. I primi alimenti fermentati sono nati quasi sicuramente per caso, ma l'uomo ha imparato rapidamente a manipolare le condizioni che favorivano le fermentazioni. La naturale presenza di microrganismi fermentanti in molte materie prime di origine animale e vegetale e il loro sviluppo in condizioni favorevoli hanno consentito le prime trasformazioni e fermentazioni casuali, e suggerito gli studi successivi per l'ottenimento di prodotti fermentati. Diversi gruppi di microrganismi intervengono in molte fermentazioni di alimenti di origine vegetale e animale: i più importanti sono i batteri lattici, i microstafilococchi e i coliformi.

Oltre all'attività di fermentazione, molti di questi microrganismi sono in grado di produrre particolari sostanze, genericamente indicate con il nome di batteriocine, capaci di inibire o rallentare la crescita di diversi microrganismi patogeni.

A tutt'oggi sono state caratterizzate quattro distinte classi di batteriocine prodotte dai batteri lattici, identificate sulla base di caratteristiche biochimiche e genetiche. Tra le numerose batteriocine una delle più comuni è la nisnina che, prodotta dalla fermentazione di alcuni ceppi di *Lactococcus lactis*, esplica la sua azione battericida, in particolare su batteri Gram positivi.

Lo scopo del lavoro è stato quello di selezionare e caratterizzare ceppi batterici con attività antagonista nei confronti di microrganismi patogeni, al fine di utilizzarli quali starter o co-starter in produzioni casearie. A tal fine sono stati preparati e analizzati diversi lotti di caseificazioni in un impianto pilota al fine di valutare l'attività inibente di un ceppo di *L. lactis* nei confronti di *Listeria monocytogenes* nel corso della maturazione.

MATERIALI E METODI

Nel corso di un progetto finalizzato all'identificazione di microrganismi lattici autoctoni in prodotti agroalimentari tradizionali della Regione Piemonte, il Laboratorio Controllo Alimenti ha potuto creare una cospicua ceppoteca di batteri lattici. A partire da tale ceppoteca, si è voluto identificare un ceppo che avesse le seguenti caratteristiche:

- inibizione *in vitro* di *L.m*. con metodica in Piastra (1);
- assenza di produzione di ammine biogene (tiramina, istamina, 2-feniletilammina e triptamina) in condizioni di microcaseificazioni.

Un ceppo di *Lactococcus lactis* isolato da un formaggio a latte crudo bovino è risultato avere le caratteristiche adatte per effettuare *in vivo* lo studio di inibizione di *L.monocytogenes*.

Al fine di verificare il comportamento del ceppo in corso di caseificazione, si sono realizzate due caseificazioni per la produzione di formaggio tipo Toma, a latte vaccino crudo, intero, con stagionatura di circa 60 giorni.

Il processo produttivo del formaggio è riassunto nella tabella 1.

Tabella 1: Processo produttivo del formaggio tipo Toma prodotto sperimentalmente

	OPERAZIONE	NOTE
1	Riscaldamento latte a 37 °C	Circa 60' a 37°C
2	Aggiunta di *L. monocytogenes*	10^3 – 10^5 ufc/mL
3	Riscaldamento del latte a 40 °C	
4	Aggiunta del lattoinnesto	2 g / 100 L di latte
5	Aggiunta del ceppo 92	10^7 ufc/mL
6	Aggiunta del caglio	8 mL / 25 L di latte
7	Sosta della cagliata	40' a 37 °C
8	Rottura della cagliata a nocciola	
9	Spurgo della cagliata	10' a 37 °C
10	Travaso in fascere e pressatura	6 ore
11	Ribaltamento forme e pressatura	Overnight
12	Salamoia satura	8 ore a 11 °C
13	Stagionatura	60 gg; 11°C; UR 90%

Gli inoculi di *L. monocytogenes* sono stati allestiti partendo da una coltura di 2 diversi ceppi di campo isolati da prodotti a base di latte appartenenti rispettivamente ai sierotipi 1/2a e 3a. Lo starter commerciale è stato utilizzato secondo le dosi consigliate di 2 g ogni 100 L di latte: esso era stato preventivamente testato *in vitro* ed era risultato essere non inibente verso *L. monocytogenes*.

In ciascuno dei 2 lotti di caseificazione sono state preparate 3 diversi formulazioni sperimentali di caseificazioni (A, B e C) riassunte in tabella 2.

Tabella 2: Composizione delle diverse formulazioni di caseificazione utilizzate nella fase sperimentale

FORMULA	Starter commerciale	L. monocytogenes	L. lactis
A	SI	SI	NO
B	SI	SI	SI
C	NO	SI	SI

La formulazione A rappresenta il controllo negativo di caseificazione; la formulazione B è utile per dimostrare la attività inibente del ceppo in esame in un ambiente del tutto simile a quello di un formaggio Toma; la formulazione C, infine,

oltre a valutare l'attività inibente del ceppo, è utile per valutarne le caratteristiche fermentative e l'attività casearia.
Per ogni lotto di caseificazione sono state prodotte forme in numero sufficiente ad effettuare campionamenti ad intervalli di tempo regolari (latte, cagliata, giorni 1, 3, 5, 7, 15, 30 e 45) durante la maturazione. Sui campioni è stata effettuata l'analisi per il conteggio di *L. monocytogenes* (ISO 11290-2).

Grafico 1: Andamento di L.monocytogenes nelle 3 formulazioni del lotto 1

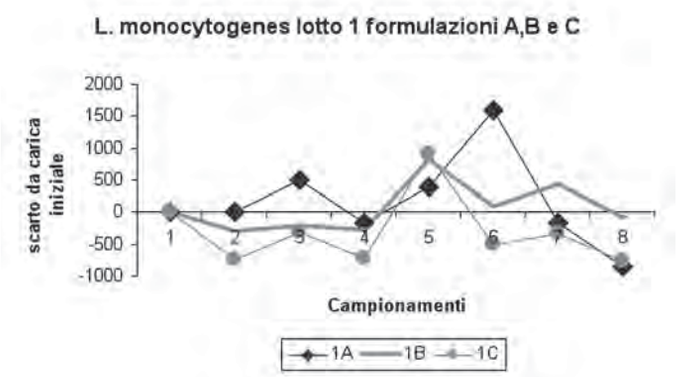
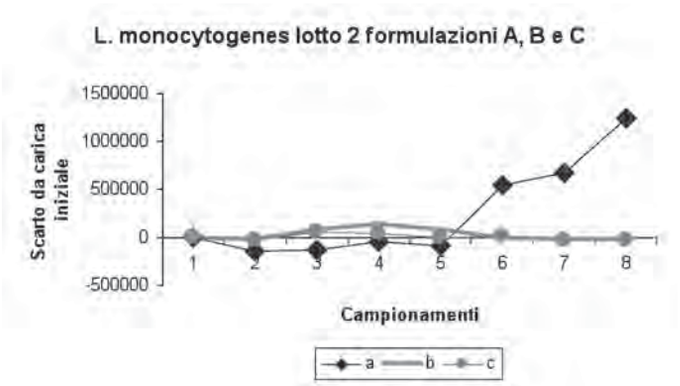


Grafico 2: Andamento di L.monocytogenes nelle 3 formulazioni del lotto 2



RISULTATI E DISCUSSIONE

I grafici 1 e 2 riportano i risultati in ufc/g di *L. monocytogenes* presenti nei campioni: tali valori sono espressi come scarti rispetto al conteggio del latte utilizzato per la caseificazione.
L. monocytogenes nel lotto 1 (grafico 1).. La formulazione A ha mostrato cariche di *L. monocytogenes* pressoché costanti con lievi oscillazioni sia in positivo che in negativo, ma non significative, fino al prelievo n° 7: si osserva una variazione da 1000 ufc/mL nel latte fino a 840 ufc/g a 30 giorni di stagionatura. Il campione prelevato a 45 giorni conteneva cariche di *L. monocytogenes* pari a 160 ufc/g: tale variazione è da ricondursi all'abbassamento dei valori di Aw pari a 0.92, che il formaggio presentava al 45° giorno di stagionatura.
La formulazione B non ha mostrato variazioni significative nella conta di *L. monocytogenes.*
La formulazione C ha permesso di ottenere, nel corso della maturazione del formaggio, conteggi di *L. monocytogenes* minori rispetto alla carica inizialmente inoculata nel latte. Se si esclude il prelievo n° 5, in cui si è verificato un incremento della carica del patogeno, la formulazione C ha permesso di ottenere i migliori risultati migliori per il controllo di *L. monocytogenes.*
L. monocytogenes nel lotto 2 (grafico 2). Fino al campionamento n° 5, le 3 formulazioni A, B e C hanno fatto rilevare cariche di *L. monocytogenes* sovrapponibili a quelle inoculate nella materia prima (circa 104 ufc/g) con variazioni, sia in positivo che in negativo, non significative. Tuttavia, dal campionamento 6, la formulazione A ha fatto rilevare un graduale e costante aumento della carica del patogeno, mentre le formulazioni B e C hanno continuato a evidenziare cariche minori di quelle iniziali.
Dal primo lotto produttivo si evince che il ceppo in esame non sembra in grado di contrastare in modo del tutto efficace *L. monocytogenes*, poiché le differenze tra le varie composizioni del prodotto non sono significative; al contrario, le differenze riscontrate nelle cariche di *L. monocytogenes* nel lotto n°2 suggeriscono un'attività inibente nei confronti del patogeno da parte del ceppo di *L. lactis* in esame. Infatti le formulazioni contenenti il ceppo in studio, con o senza lo starter commerciale, sono risultate, a maturazione inoltrata, significativamente diverse dalla formulazione A, che rappresenta il controllo negativo.
In conclusione, i due lotti di formaggio prodotti per lo studio delle caratteristiche del ceppo di *L. lactis* hanno dato risultati discordanti: per questo motivo, nonostante il ceppo fosse dotato *in vitro* di buone capacità inibenti nei confronti di *L. monocytogenes*, sono necessari ulteriori approfondimenti per valutarne l'effettiva applicabilità in campo. Infatti, l'ambiente complesso e la microflora mista presenti all'interno di un formaggio a latte crudo, si discostano dalle condizioni che si possono ottenere durante allestimento di prove *in vitro*. Per questo motivo, nonostante le caratteristiche del ceppo in relazione all'attività *in vitro* o alla produzione di amine biogene siano incoraggianti, le caseificazioni sperimentali hanno mostrato la necessità di effettuare ulteriori produzioni a conferma dell'attività inibente del ceppo in campo.

BIBLIOGRAFIA

1- Teixeira de Carvalho, R. Aparecida de Paula, H.C. Mantovani and C. Alencar de Moraesa (2006). *Inhibition of Listeria monocytogenes by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami***.** Food Microbiology 23;213-219

Finanziamento Ricerca corrente 2006 (IZSPLV 02/06) "valutazione della presenza di ceppi produttori di batteriocine per il controllo di microrganismi patogeni in alimenti di origine animale per migliorare la qualità e la sicurezza dei prodotti tradizionali piemontesi

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTI (MRSA) IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

[1]Bianchi D.M., [1]Gallina S., [1]Traversa A., [2]Parlato C.,[2]Fossati L.,[2]Cavallerio P., [1]Mantoan P., [1]Decastelli L.

[1] *NRL per gli Stafilococchi coagulasi positivi compreso S. aureus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;* [2] *Ospedale San Giovanni Battista, Laboratorio di Microbiologia, Torino*

Key words: *MRSA; mecA gene; spa-Typing*

SUMMARY

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) represent an important concern in human medicine because of the relevance of infections and the difficulty in therapy. Recently some authors reported the possibility of human infections from meat and dairy products. The aim of this study is to investigate the presence of MRSA in S.*aureus* strains isolated from different food. Strains were analyzed both for phenotypic and genotypic expression of methicillin resistance. Furthermore, *spa*-typing was performed on MR strains in order to identify the staphylococcal cassette chromosome.

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus è comunemente isolato a livello cutaneo e nasofaringeo nel 30% della popolazione umana, senza causare malattia. Nei soggetti immunocompromessi, tuttavia, *S. aureus* è responsabile di gravi infezioni e l'acquisizione di proprietà di resistenza antibiotica ha contribuito a rendere difficoltosa la terapia nei confronti di alcuni ceppi. In particolare alcuni ceppi di *S. aureus* sono dotati della cosiddetta meticillino-resistenza (MR), che, codificata dal gene *mec-A* conferisce resistenza a tutti i beta-lattamici grazie alla sintesi di una Penicillin Binding Protein (PBP) modificata con bassa affinità per i betalattamici appunto.

Ad oggi le infezioni da MRSA sono classificate in base all'origine dell'infezione in 4 diversi gruppi: le HA-MRSA (hospital acquired), le CA-MRSA (community acquired) e, di recente introduzione, le LA-MRSA (livestock acquired) strettamente legate alle FBA-MRSA (foodborne acquired) correlate al consumo di alimenti contenenti ceppi meticillino resistenti (MR). Queste ultime due classi in particolare, sembrano correlate al settore suinicolo, avendo casuato sintomatologia in personale a stretto contatto con gli animali (allevatori e veterinari) (5).

Inoltre, è da notare il reperimento frequente di un complesso clonale emergente (classificato con il metodo MLST - MultiLocus Sequence Type - come ST398) che rappresenta il maggior isolato in ambito umano e che, come emerge anche dalla recente pubblicazione del Parere EFSA (2), rappresenta un frequente reperto anche in ambito veterinario. Questo stesso clone è in grado di aumentare la propria patogenicità grazie alla produzione della leucocidina di Panton Valentine (PVL) indotta dalla presenza del gene omonimo e che provoca necrosi tissutale a livello cutaneo e polmonare.

Infine, è da segnalare che la meticillino-resistenza nei CA-MRSA è generalmente crociata e limitata ai beta-lattamici e ai carbapenemi, mentre negli HA-MRSA si accompagna spesso a resistenza nei confronti di altri antibiotici, limitando ancor più la scelta terapeutica.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la prevalenza di ceppi MRSA tra quelli di *S.aureus* isolati da alimenti di origine animale e di verificare la concordanza di due test fenotipici per la determinazione della MR; in secondo luogo lo studio ha voluto caratterizzare dal punto di vista fenotipico e genotipico i ceppi MRSA riscontrati.

MATERIALI E METODI

Nel periodo gennaio-agosto 2008 sono stati isolati presso il Laboratorio Controllo Alimenti dell'IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta 236 ceppi di *S. au*reus da varie matrici alimentari prelevate nell'ambito dei campionamenti ufficiali PRISA Regione Piemonte 2008. Il dettaglio delle tipologie di alimenti da cui i ceppi derivavano è riportato nel grafico 1.

Tali ceppi sono stati isolati dalla matrice alimentare con metodo ISO 6888-2/1999, identificati con gallerie miniaturizzate (API – BioMérieux) e stoccati a -18 °C in cryobank (Mast Diagnostic) fino al momento del loro utilizzo per le indagini di seguito riportate.

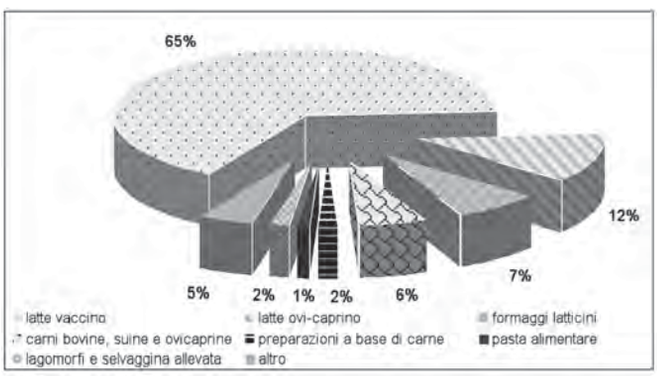


Grafico 1: Tipologie di alimenti da cui i ceppi di *S. aureus* sono stati isolati

I ceppi sono stati rivitalizzanti mediante semina su Agar Sangue (Microbiol) e incubazione overnight a 37 °C. Successivamente i ceppi sono stati testati per la valutazione fenotipica della MR e sottoposti a prove di biologia molecolare per la rilevazione di geni codificanti per tale proprietà.

Prove fenotipiche di resistenza

Tali prove sono state condotte con l'utilizzo di un terreno cromogeno pronto all'uso (MRSA Brilllance – Oxoid) sul quale i ceppi MRSA, dopo un'incubazione di 18-24 ore a 37 °C, sviluppano colonie di colore blu denim.

Inoltre, si è proceduto all'esecuzione del test kirby Bauer in Mueller-Hinton agar (Microbiol) con dischetto di cefoxitina 30 µg: secondo le linee guida del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI Gennaio 2008) i ceppi MRSA mostrano alone di inibizione ≤ a 21mm.

Il ceppo MRSA ATCC 49775 è stato utilizzato quale controllo positivo per entrambe le prove.

Prove di biologia molecolare

I ceppi risultati resistenti sia sul terreno cromogeno che al test di diffusione in agar sono stati sottoposti ad estrazione del DNA (Ultraclean microbial DNA solution kit – MO BIO Laboratories) per l'esecuzione della PCR per la ricerca del gene *mecA* secondo il protocollo operativo descritto in letteratura (6).

I ceppi *mec*A positivi sono stati sottoposti alla ricerca dei

geni codificanti la produzione della Leucocidina di Panton Valentine tramite simplex PCR (3) e al sequenziamento del gene *spa* (*spa*-typing) (1).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La prevalenza di ceppi MRSA risulta differente a seconda del metodo utilizzato: dei 236 ceppi di *S. aureus* analizzati nel corso della ricerca, 8 (2.94%) sono risultati MRSA sul terreno cromogeno Brilliance; tuttavia, solo 1 ceppo su 236 (0.42%) è risultato tale anche al test della cefoxitina. Quest'ultimo ceppo è stato l'unico a dare esito positivo anche alla ricerca del gene *mecA*: gli altri 7 ceppi risultati MRSA al terreno cromogeno, quando sottoposti a prove molecolari, hanno infatti dato esito negativo. In altri termini quindi, il test su terreno cromogeno ha evidenziato 7 campioni positivi che non sono poi risultati essere MRSA né al test Kirby Bauer né alle tecniche biomolecolari per il rilevamento dei geni della MR. Inoltre, la ricerca del gene *PVL* ha dato esito negativo negli 8 ceppi sospetti MRSA che non sono quindi in grado di sintetizzare la leucocidina di Panton Valentine. Il ceppo confermato MRSA, sia dal punto di vista fenotipico che genotipico, è risultato appartenete allo *spa*-type t899, mentre i rimanenti 7 ceppi sono ascrivibili allo spa-type t091.
La tabella 1 riassume le caratteristiche del ceppo confermato MRSA isolato nel corso del presente studio a partire da latte bovino.

Tabella 1: Caratteristiche del ceppo MRSA isolato

S. aureus	
Matrice di isolamento	latte di massa vaccino
Produzione di enterotossina	POS
MRSA Brilliance Oxoid	POS
Test di Kirby Bauer con Cefoxitina	14 mm
MIC Oxacillina	> 2 µg/ml
PCR- ricerca gene *mecA*	POS
PCR- ricerca gene *PVL*	NEG
spa-type	t899

La prevalenza di MRSA confermata negli alimenti da noi testati (0.42%) ricalca i risultati ottenuti in altri studi che riportano valori intorno allo 0.5% da carne di pollo (1). Anche in questo caso, gli autori avevano individuato dapprima i ceppi con espressione fenotipica della MR e successivamente questi erano stati sottoposti ad indagini biomolecolari. Altri studi invece riportano percentuali maggiori di MRSA negli alimenti (3.75% in latte e derivati) (4): tuttavia è da sottolineare che in tale indagine, contrariamente a quanto svolto nel presente lavoro, le analisi di tipo biomolecolari (ricerca del gene *mecA*) sono state svolte indipendentemente dalla espressione fenotipica della MR. È noto infatti che l'espressione fenotipica della resistenza può essere relativa solo ad alcune cellule dello stesso clone (fenomeno della eteroresistenza) (4).
Il ceppo MRSA isolato da latte bovino nel presente studio è stato identificato come *spa*-type t899: sebbene non sia stato possibile effettuare l'analisi con il metodo MLST per confermare il complesso clonale di appartenenza, secondo il gruppo BIOHAZ dell'EFSA i dati ottenuti mediante *spa*-typing possiedono ampia congruenza con i risultati del metodo MLST. Dai dati bibliografici disponibili, ceppi con *spa*-type t899 isolati da carne suina, di pollo, tacchino e faraona, sottoposti a MLST, risultano appartenere al Sequence Type ST398. Concludendo quindi, il ceppo isolato nel corso del nostro studio può essere considerato del medesimo complesso clonale ST398 riportato come emergente anche negli altri paesi europei.
L'esecuzione dei due test fenotipici permette di concludere che il test con terreno cromogeno può, a nostro avviso, essere impiegato come metodo di screening, in quanto di facile esecuzione, ma deve essere affiancato da tecniche più specifiche sia di tipo microbiologico classico che molecolare. Inoltre, si sottolinea che il test risulta talvolta difficilmente interpretabile per la presenza di colonie con tonalità di colore non chiaramente classificabili.
I risultati di questo lavoro supportano il parere espresso di recente dall'EFSA che raccomanda lo sviluppo di un sistema di sorveglianza e monitoraggio nell'uomo e negli alimenti al fine di valutare l'andamento della diffusione ed evoluzione dei ceppi MRSA di origine animale.

BIBLIOGRAFIA

1. De Boer E., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., Wit B., Huijsdens X.W., de Neeling A.J., Bosch T., van Oosterom R.A.A., Vila A., Heuvelink A.E. (2009). Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.007
2. European Food Safety Authority (2009). Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods. The EFSA Journal 993, 1-73;
3. Lina G., Piemont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F. Etienne J. (1999). Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing Staphylococcus aureus in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 29:1128–32;
4. Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V. (2007). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117 219–222G;
5. Scott Weese J, Van Duijkeren E (2009) Methicillin resistant S. aureus and S. pseudointermedius in veterinary medicine, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039
6. Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Louie T., Conly J.M. (2005). Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, No. 10, p. 5026-5033;

Finanziamento Ricerca corrente 2007: "Isolamento e identificazione di S.aureus meticillino-resistente (CA-MRSA) negli alimenti e nell'uomo: problematica emergente in sanità pubblica"

UN MODELLO ORGANIZZATIVO PER LA GESTIONE DEI CAMPIONAMENTI E DELLE ANALISI NELL'AMBITO DEL PIANO NAZIONALE RESIDUI

[1]Bortolotti L.,[1]Angeletti R., [2]Fabris C.,[1]Rostellato D.,[1]Breda T.,[1]Pengo M.,[1]Capello K.,[1]Marangon S.

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro [2]Regione Veneto -Unità di Progetto per la Sanità Animale ed Igiene Alimentare, Venezia

Key words: PNR, programmazione attività, BDR

INTRODUZIONE

Il Ministero del Lavoro, Salute e Politiche sociali predispone annualmente in esecuzione delle direttive comunitarie, il "*Piano Nazionale per la ricerca dei residui negli animali e nei prodotti di origine animale (PNR*)" che si prefigge la sorveglianza e il monitoraggio della presenza nella filiera produttiva di residui di sostanze farmacologicamente attive vietate o autorizzate in ambito veterinario e di contaminanti ambientali. Il PNR prevede a livello nazionale il campionamento di circa 30.000 campioni all'anno, di cui il 15% circa vengono eseguiti in Veneto. L'IZSVe effettua ogni anno circa 4.600 esami su 14 differenti matrici e per 44 gruppi di molecole raggruppate in 2 categorie: A - Sostanze ad effetto anabolizzante e non autorizzate- e B - Medicinali veterinari e agenti contaminanti- da prelevarsi sia in allevamento che negli impianti di macellazione.

I campioni sono ripartiti sulla base del patrimonio zootecnico e delle produzioni animali, dichiarati annualmente dalle Regioni e P.A., che a loro volta hanno il compito di attuare il Piano Regionale Residui (PRR), in cui vengono dettagliati il numero, il tipo di campioni e le modalità con cui effettuare il campionamento. La corretta distribuzione territoriale dei campioni e la organizzazione dell'attività di campionamento del PRR sul territorio, sono il presupposto essenziale per ottimizzare la operatività dei Servizi Veterinari (SV) e del Laboratorio che effettua le analisi.

La programmazione delle attività nell'ambito del PRR può essere realizzata con molta precisione, rispettando comunque le modalità di effettuazione del campione che deve essere "imprevisto, inatteso ed eseguito in momenti non fissi".

In Veneto viene utilizzato un modello organizzativo che si avvale di un sistema informatico semplice ed efficace che consente la ripartizione automatizzata dei campioni tra le diverse AZ-ULSS e la equilibrata distribuzione degli stessi durante l'anno.

MATERIALI E METODI

I sistemi informatici di riferimento sono:

- BDR (Banca Dati Regionale dell'Anagrafe Zootecnica del Veneto), in cui sono censite e gestite le informazioni relative agli allevamenti, agli animali e agli stabilimenti di macellazione con associati i dati delle relative produzioni.
- IZILAB (gestionale dei laboratori dell'IZSVe) in cui vengono registrati gli esami eseguiti nell'ambito del PRR
- Sistema nazionale NSIS/PNR che consente lo scarico degli elenchi delle molecole da ricercare per Regione e P.A. e l'invio degli esami effettuati annualmente sul territorio

Le analisi da effettuarsi in ambito regionale vengono acquisite dal sistema NSIS/PNR e importate in una specifica procedura realizzata in linguaggio SQL, che accede direttamente agli archivi della BDR e che distribuisce tali analisi per AZ-ULSS, secondo un sistema di pesi determinato in base:

- al patrimonio zootecnico (dati registrati in BDR),
- ai dati di macellazione dei bovini (dati dell'archivio dei capi macellati) e delle altre specie animali (dati produttivi associati agli impianti in BDR).

Infine, una volta calcolata la numerosità campionaria delle analisi che ogni AZ-ULSS deve effettuare, la procedura seleziona in modo casuale la tipologia di molecola da ricercare e la settimana in cui effettuare il prelievo, assicurando una distribuzione eterogenea delle tipologie dei test e prevedendo un intervallo di pausa in concomitanza dei periodi in cui si concentrano le ferie del personale del laboratorio.

Ad inizio anno la Regione consegna al SV un calendario dei prelievi suddiviso per settimana con la indicazione del luogo di prelievo (se in allevamento o in macello), il tipo di matrice e di analisi da richiedere.

Dal sistema IZILAB viene estrapolato con cadenza periodica un report con le analisi effettuate per molecola, matrice, luogo di prelievo e AZ-ULSS richiedente, che consente il monitoraggio dell'andamento del PRR alla Regione.

RISULTATI

Nel corso del 2008 sono stati analizzati 4.664 campioni nell'ambito del PNR. La realizzazione di un sistema informatico integrato regionale per la programmazione delle attività di campionamento è risultata efficace a livello di Laboratorio nell'ottimizzazione:

- dell'afflusso dei campioni con possibilità di razionalizzare l'utilizzo delle risorse strumentali
- della gestione delle risorse umane

con conseguente razionalizzazione della spesa per le analisi e riduzione dei tempi di attesa degli esiti.

A livello di SV territoriali la disponibilità di un calendario dei campionamenti, consente di organizzare efficacemente il personale e di pianificarne l'attività. Viene comunque preservata la facoltà decisionale da parte del SV, nella scelta dell'allevamento o del macello in cui effettuare il campionamento e delle partite da campionare.

A livello regionale sono disponibili gli strumenti idonei per esercitare efficacemente la funzione di programmazione e coordinamento delle attività sul territorio di propria competenza. Risulta inoltre possibile monitorare l'attuazione del PRR in corso d'opera ed applicare immediatamente interventi correttivi.

La procedura effettua la rendicontazione del PRR in modo automatizzato al sistema NSIS/PNR.

CONCLUSIONI

L'esperienza maturata negli ultimi 3 anni ha dimostrato che il modello organizzativo adottato è stato accolto favorevolmente a più livelli.

Il principale punto critico è in genere rappresentato dal mancato rispetto da parte di alcuni SV del calendario dei campionamenti, che comunque non influisce in modo sensibile sull'organizzazione generale del Piano. Per trarre tutti i benefici che una accurata programmazione delle attività offre e per automatizzare ulteriormente il flusso dati, nell'immediato futuro si può prevedere la integrazione del calendario dei campionamenti nel software di gestione delle attività dei SV, in modo che anche a livello territoriale si disponga di una consolle per potere monitorare lo stato di avanzamento dei lavori a livello locale.

RIASSUNTO.

IZSVe has developed an information system in order to schedule sampling activities in the framework of the National Residue Monitoring Programme.

The system is based on the regional livestock database and on the laboratory database, it allows to stratify the number of samples among the Local Health Units proportionally to the presence of livestock. Furthermore, sampling activity is distributed throughout the year, in order to enable both the laboratory and the LHUs to efficiently plan their activity and resources' utilisation.

This paper describes the IT applied and summarizes the results obtained in the last three years.

CRITICITA' NELLA GESTIONE DELLE QUALIFICHE SANITARIE AZIENDALI DEL PIANO VOLONTARIO IBR IN REGIONE PIEMONTE

Bottero P.[1], Careddu M.E.[2]., Cesano L[3]., Fissore E.[1]
[1] Medico veterinario libero professionista Cuneo, [2] Istituto Zooprofilattico sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – sezione Cuneo, [3]PMPPV Cuneo

Key Words: IBR, aspetti critici

SUMMARY
Starting in 2002, the Piedmont Region has initiated a voluntary plan for the eradication of the infectious bovine rhinotracheitis (IBR) (DGR 24-8144), in order to improve the sanitary condition of farms in Piedmont and remain in line with current EU and national directives. The aim of this work is to examine some critical aspects of the plan of voluntary eradication of IBR and the resulting changes made over the years.

INTRODUZIONE
Con il termine Rinotracheite infettiva del bovino (Ibr) viene indicato il complesso delle malattie sostenute da Bovid Herpesvirus I (BHV-I), che sono: rinotracheite infettiva del bovino (Ibr), vulvovaginite pustolosa infettiva (IPV), ipofertilità, aborto, congiuntivite ed encefalite (1,2,3).
A partire dal 2002 la Regione Piemonte ha iniziato un piano volontario di eradicazione della malattia (DGR 24-8144), al fine di migliorare la condizione sanitaria degli allevamenti piemontesi e rimanere in linea con le attuali direttive comunitarie, nazionali ed extraregionali. Nel 2007 la Direzione Sanità della Regione Piemonte ha finanziato un progetto specifico, affidato al Presidio Multizonale di Profilassi e Polizia Veterinaria di Cuneo, volto a sostenere e intensificare l'attività di promozione del Piano, verificare le criticità che ancora ostacolano il raggiungimento dei risultati attesi ed individuare i principali fattori di rischio responsabili delle reinfezioni.
Lo scopo del presente lavoro è valutare alcuni aspetti critici nella gestione delle qualifiche sanitarie aziendali del piano del Piano volontario di eradicazione dell'IBR in Regione Piemonte e le conseguenti modifiche effettuate negli anni.

MATERIALI E METODI
Le aziende che aderiscono al Piano Volontario di eradicazione dell'IBR devono sottoscrivere insieme al veterinario aziendale e al veterinario del distretto un piano di gestione che prevede l'applicazione di tutte le misure di profilassi interna ed esterna atte al controllo della malattia.
Gli animali di età superiore a 12 mesi vengono sottoposti annualmente a prelievo di sangue e i campioni vengono inviati all'Istituto Zooprofilattico territorialmente competente accompagnati dal modello 2/33 in cui vengono specificate le vaccinazioni effettuate sui capi sottoposti a prelievo e la conseguente qualifica aziendale.
Se i capi sottoposti a prelievo risultano, dalla raccolta dei dati anamnestici, non vaccinati, verrà eseguito il test ELISA indiretto, per la ricerca di anticorpi totali nei confronti di BHV1; se i capi risultano invece vaccinati con vaccino marker verrà eseguito un test ELISA gE per competizione; nel caso in cui l'anamnesi è sconosciuta o ci siano gruppi misti il cui esito, alla prima indagine di screening, è positivo per ELISA Actot e negativo per ELISA gE, viene utilizzato il test di conferma ELISA gB per competizione per la ricerca degli anticorpi contro la glicoproteina B (4,5).

In base all'esito delle prove di laboratorio il veterinario del distretto definisce la qualifica sanitaria dell'azienda (6):

AZIENDA POSITIVA allevamento con capi positivi da malattia o vaccinati con vaccino tradizionale

AZIENDA NEGATIVA allevamento con tutti i capi negativi in cui non è ancora stato eseguito il secondo controllo per l'attribuzione della qualifica di Ufficialmente Indenne/ Indenne.

AZIENDA NEGATIVA VACCINATA DELETO allevamento in cui sono presenti capi vaccinati deleto ed eventualmente capi negativi, in cui non è ancora stato eseguito il secondo controllo per l'attribuzione della qualifica di Ufficialmente Indenne/Indenne.

AZIENDA INDENNE allevamento in cui sono presenti capi vaccinati con vaccino deleto ed in cui i capi in età diagnostica sono risultati negativi alla ricerca degli Ac totali o Ac gE a due controlli effettuati a distanza di 2 – 12 mesi.

AZIENDA UFFICIALMENTE INDENNE: allevamento in cui non sono presenti capi vaccinati ed i capi in età diagnostica sono risultati negativi a due controlli ufficiali effettuati a distanza di 2 – 12 mesi.

Tutti i dati relativi alle prove effettuate nell'azienda inizialmente erano soltanto cartacei, a partire dal 2004 sono stati resi informatizzati e inseriti nella banca dati ARVET, gli anni successivi il controllo dei dati è stato di secondo livello con un confronto degli esiti anno per anno.

A.R.VET. è l'acronimo di Anagrafe Regionale Veterinaria, nato per l'informatizzazione degli archivi anagrafici delle aziende zootecniche e successivamente ampliato e modificato per permettere la registrazione degli accertamenti veterinari effettuati in tutti gli allevamenti.

Al fine di comprendere la reale situazione sanitaria IBR nella regione Piemonte è stato fatto uno studio per valutare la circolazione virale negli allevamenti presenti nelle ex ASL 15-17/2-18 (ora ASLCN1 e 2) utilizzando in prima istanza i dati presenti in ARVET nell'intervallo di tempo compreso tra l'01/01/07 e il 31/12/07 e successivamente analizzando nel dettaglio le singole aziende positive.

RISULTATI

Dall'analisi preliminare dei dati presenti in ARVET è emerso quanto segue:

- totale allevamenti presenti: **3096**
- totale allevamenti aderenti al piano IBR: **1725**
- allevamenti positivi esaminati: **1078**
- allevamenti con possibile circolazione virale segnalati da Arvet: **368** [In queste aziende sono presenti nuovi capi positivi rispetto all'anno precedente]
- allevamenti con capi reinfetti non segnalati da ARVET: **35**

Uno dei limiti del sistema ARVET è che segnala come reinfezione tutti gli allevamenti nei quali bovini già sottoposti a diagnosi con esito negativo diventano positivi ad ulteriori prove diagnostiche.
Questo dato non è reale in quanto:

- alcuni bovini vaccinati con vaccino tradizionale sono in un primo tempo stati considerati positivi senza ricorrere all'esame sierologico; se negli anni successivi erroneamente sono stati sottoposti a diagnosi sierologica con esito positivo, vengono considerati capi reinfetti, pur non essendolo.
- i bovini positivi giovani che vengono testati per la prima volta non vengono considerati al fine dell'individuazione degli allevamenti con reinfezione;

- i capi positivi su cui è stata effettuata una riprova il cui esito è negativo, continuano ad essere conteggiati nei capi con reinfezione (questa problema era presente nel momento in cui è stato effettuato lo studio, ora è stato risolto).

Come si può notare le aziende con nuove positività nel 2007 sono **403**, frutto dei 368 allevamenti segnalati da ARVET e dei 35 non segnalati, ma emersi dall'analisi effettuata.

L'analisi approfondita delle 403 aziende con nuove positività è stata effettuata in collaborazione con i referenti IBR ed i veterinari dei distretti interessati e ha permesso di distinguere:

- **174** le aziende con circolazione virale, in quanto erano presenti ad ogni controllo annuale capi giovani nuovi positivi o animali con sintomi clinici riferibili a IBR;

- **136** le aziende senza circolazione virale, in cui le nuove positività erano da riferirsi ad errori successivamente corretti;
- **93** le aziende con situazione sanitaria incerta ed era necessario quindi eseguire delle riprove

Negli allevamenti con situazione sanitaria incerta sono stati eseguiti degli approfondimenti diagnostici al fine di confermare o escludere la circolazione virale

TABELLA 1: Riprove

Allevamenti in qualifica con situazione sanitaria incerta (esami sierologici incongruenti con dato sanitario)		
	Frequenza	**Percentuale**
Esclusa reinfezione	68	73,12%
Confermata Reinfezione	11	11,83%
Non Effettuate	14	15,05%
Totale aziende	93	100,00%

L'aver effettuato un ulteriore controllo sierologico a seguito di dati analitici discordanti dall'atteso ha consentito la corretta classificazione sanitaria degli allevamenti controllati: in 68 aziende la riprova ha dato esito negativo e quindi è stata esclusa la reinfezione, in 11 invece la riprova ha confermato il risultato precedente

DISCUSSIONE

La presenza di un sistema informatizzato unico (ARVET) per tutta la regione consente di disporre sia a livello locale sia a livello regionale di uno strumento per il controllo del territorio, per la programmazione e la verifica dei piani di eradicazione, per una miglior gestione dei focolai di malattie infettive(6).

Inoltre tra i vantaggi del sistema informatico bisogna annoverare la migrazione automatica dei risultati degli esami sierologici e il conseguente minor lavoro di inserimento dei dati e la riduzione della possibilità di errore.

Uno svantaggio della gestione automatizzata è dato dalla rigidità dei sistemi informatici ovvero la non possibilità di interpretazione del dato, perciò in caso di esiti incongruenti si crea una mis-classificazione sanitaria dell'azienda.
Gli errori più frequentemente riscontrati nel corso del presente studio derivano da una richiesta esami errata per anamnesi vaccinale non corretta (e conseguente applicazione di una procedura diagnostica non opportuna) oppure da errori di laboratorio.

Risulta evidente che l'attività di controllo dei dati sierologici di ritorno da parte del veterinario ufficiale che conosce la situazione sanitaria dell'azienda consenta una lettura critica e obiettiva dei risultati rispetto ad una standardizzazione da tabella informatica.

L'analisi delle prove diagnostiche effettuate, ed eventuali riprove nel caso in cui l'esito degli esami non corrisponda alla situazione sanitaria dell'azienda, rappresenta il punto di partenza per verificare l'andamento del piano ed intervenire tempestivamente nei casi problematici e per migliorare il grado di sensibilità dei test diagnostici utilizzati.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Engels, M.; Ackermann, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. Veterinary Microbiology Volume: 53 Issue: 1/2 Page(s): 3-15, 1996
2. Jones, C.; Chowdhury, S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. Animal Health Research Reviews Volume: 8 Issue: 2 Page(s): 187-205, 2007.
3. Meyer, G.; Lemaire, M.; Ros, C.; Belak, K.; Gabriel, A.; Cassart, D.; Coignoul, F.; Belak, S.; Thiry, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. Archives of Virology Volume: 146 Issue: 4 Page(s): 633-652, 2001.
4. Nardelli, S., Farina, G., Lucchini, R., et al. Dynamics of infection and immunity in a dairy cattle population undergoing an eradication programme for Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR). Preventive Veterinary Medicine Volume: 85 Issue: 1/2 Page(s): 68-80, 2008.
5. Nuotio, L.; Neuvonen, E.; Hyytiainen, M. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. Acta Veterinaria Scandinavica Volume: 49 Issue: 3 Page(s): (12 January 2007)
6. Regione Piemonte, Direzione Sanità Pubblica Settore Sanità animale e Igiene degli allevamenti. Manuale utente Arvet.

INDAGINE CONOSCITIVA SULLA PRESENZA DI ALLERGENI IN ALIMENTI A BASE DI CARNE

Campagna M.C., Cavallina R., Condoleo R., Marozzi S., Morena V., Saccares S.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana – Sede Centrale di Roma (Italia)

Keywords: allergene, alimenti a base di carne, additivi

ABSTRACT
The purpose of this work is to present the results of the cognitive research, conducted in 2008 in the Lazio region, on the presence of allergens in food meat. Although allergens are often used as processing aids in food industry and are harmless to most people, some substance such as milk and egg proteins and lactose may be damaging for the health of sensitive subjects.

INTRODUZIONE
Un allergene è una sostanza solitamente innocua per la maggior parte delle persone, ma in taluni individui (soggetti allergici) è in grado di determinare una serie di effetti indesiderati. Prurito, gonfiore, nausea, vomito, diarrea, o ancora orticaria e nei casi più gravi, difficoltà respiratorie e shock anafilattico sono le manifestazioni che si possono scatenare in seguito al contatto di un allergene con un soggetto a rischio. In seguito ad esposizione prolungata all'allergene le reazioni tendono ad aggravarsi.
Le patologie allergiche dovute a sostanze alimentari sono tra le più frequenti. Esiste infatti una percentuale di soggetti in costante aumento, per la quale alcuni alimenti o loro costituenti possono essere causa di allergie o intolleranze (1).
Al fine di tutelare la salute dei cittadini, la Commissione Europea ha emanato la direttiva CE/89/2003, recepita in Italia con il Decreto Legislativo n. 114 dell'8 febbraio 2006 e successive modifiche (2, 3, 4), che introduce una lista di sostanze considerate "allergeniche" da citare obbligatoriamente in etichetta, qualora siano presenti in un prodotto alimentare. Le sostanze attualmente considerate allergeni comprendono cereali, crostacei, uova, pesce, arachidi, soia, latte, frutta a guscio, sedano, senape, sesamo, lupini, molluschi, anidride solforosa e i loro derivati.
Sulla base delle indicazioni di tale direttiva, la Regione Lazio ha inserito nel proprio Piano Regionale Integrato dei Controlli sulla sicurezza alimentare, il benessere e la sanità animale (P.R.I.C.) uno specifico programma di campionamento per la ricerca di alcune sostanze allergizzanti in alimenti di origine animale (5).
Scopo di tale lavoro è presentare i risultati dell'indagine conoscitiva relativa alla presenza di allergeni in alimenti a base di carne nell'anno 2008 nella Regione Lazio.

MATERIALI E METODI
Il PRIC prevedeva per l'anno 2008 il campionamento in unica aliquota di 100 campioni per la ricerca delle proteine delle uova, proteine del latte (caseine e beta-lattoglobuline) e lattosio in:
A) 50 prodotti a base di carne (come da definizione del REG. 853/2004 CE Allegato 1, punto 7.1: *"i prodotti trasformati risultanti dalla trasformazione di carne o dall'ulteriore trasformazione di tali prodotti trasformati, in modo tale che la superficie di taglio permette di constatare la scomparsa delle caratteristiche delle carni fresche*").

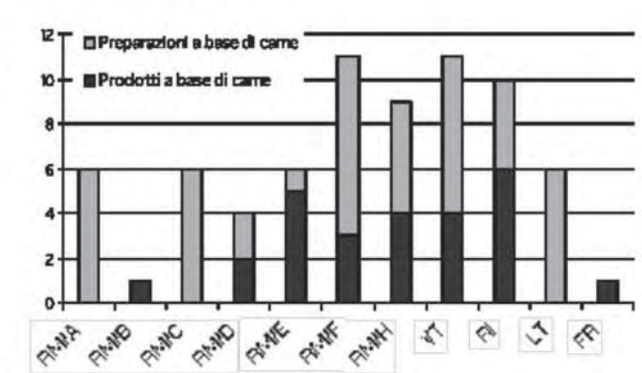
B) 50 preparazioni a base di carne, rappresentate soprattutto da hamburger. come da definizione del REG. 853/2004 CE Allegato 1, punto 1.15 **"** *Carni fresche, incluse le carni ridotte in frammenti, che hanno subito un'aggiunta di prodotti alimentari, condimenti o additivi o trattamenti non sufficienti a modificare la struttura muscolo-fibrosa interna della carne e ad eliminare quindi le caratteristiche delle carni fresche"***)**
Prerequisito essenziale per la scelta del campione da prelevare era l'assenza in etichetta di indicazioni relative alla presenza di allergeni.
Durante il 2008, le 12 ASL della regione Lazio hanno eseguito un numero di 75 campioni.
I campioni sono stati estratti mediante tamponi di estrazione specifici per tipologia di prova e poi filtrati. L'estratto proteico così ottenuto è stato testato con un saggio ELISA per la ricerca delle proteine dell'uovo e delle proteine del latte. La ricerca del lattosio è stata effettuata invece mediante metodo enzimatico basato sull'idrolisi del lattosio in D- Galattosio e D- Glucosio e dalla successiva determinazione di uno dei due monosaccaridi.

RISULTATI E DISCUSSIONE
Durante il 2008, le 12 ASL della regione Lazio hanno eseguito un numero di 75 campioni a fronte dei 100 previsti poiché il PRIC è stato emanato il 17 Marzo 2008.
Di seguito viene specificato il numero dei controlli eseguiti in relazione alla matrice ed alle ASL della regione Lazio.

Tabella 1. Campioni effettuati per la ricerca di allergeni nelle matrici alimentari indicate

Matrice alimentare	Campioni effettuati
Preparazioni a base di carne	46
Prodotti a base di carne	29

Grafico 1- Campioni effettuati per la ricerca di allergeni nelle diverse ASL della regione Lazio



Nessuno dei 75 campioni effettuati è risultato non conforme a quanto dichiarato in etichetta per la presenza degli allergeni. A tal riguardo si specifica che attualmente la normativa non prevede per gli allergeni oggetto del piano, dei limiti di riferimento, ma si affida ai limiti di rilevabilità del metodo analitico. Si precisa inoltre, che il Legislatore non ha ancora indicato un tecnica di indagine ufficiale.
E' interessante ricordare che sebbene queste sostanze siano presenti nella lista degli allergeni, rivestono un ruolo

tecnologico fondamentale per l'industria alimentare.
Il Lattosio in alcune preparazioni o prodotti a base di carne viene aggiunto come additivo al fine di conferire una giusta morbidezza del prodotto. Inoltre l'aggiunta del latte in polvere nella produzione di alcuni insaccati, facilita l'assorbimento dell'umidità della carne rendendola più compatta ed apparentemente più stagionata, non la fa calare di peso, accelera il disseccamento, dà un gusto più delicato. In particolare le proteine del latte hanno proprietà emulsionanti e leganti (6). Anche le proteine dell'uovo, ed in modo particolare l'ovoalbumina, hanno un elevato potere legante e quindi sono molto utilizzate nell'industria alimentare (per esempio per la preparazione di polpette,hamburger). Oltre all'aggiunta volontaria per scopi tecnologici la presenza di tali sostanze può derivare anche da una contaminazione accidentale. Infatti, in fase di produzione, sono possibili cross-contaminazioni che possono comportare l' "inquinamento" di un prodotto. Ad esempio l'utilizzo della stessa catena di lavorazione per più tipologie di alimenti può rappresentare un rischio.
La bibliografia in merito alla prevalenza delle allergie alimentari nell'Unione Europea è estremamente varia in funzione dell'area geografica considerata e del differente approccio diagnostico. Alcuni programmi conoscitivi sono stati promossi negli Stati Membri al fine di ottenere dati univoci e precisi.
Secondo la letteratura scientifica in materia il 19% della popolazione europea dichiara stati di allergia o malessere ,verificatesi in seguito all'assunzione di alimenti, ed il 12,2% riferisce che tali episodi di malattia si sono manifestati dopo l'ingestione di particolari prodotti (7). I dati disponibili indicano inoltre che l'incidenza di pazienti con sintomi di allergia alimentare è compresa fra il 3 ed il 35%. Pochi studi però,hanno confermato con test appropriati la diagnosi presuntiva. Quando ciò è stato fatto l'incidenza di allergia alimentare è risultata pari all'1-4% .
Gli episodi di allergia alimentare sono strettamente dipendenti dall'età dei pazienti; infatti si presentano con maggiore frequenza nei bambini e nei giovani (8). Uno studio condotto su 4491 pazienti ha identificato negli alimenti più frequentemente coinvolti in tali episodi, i vegetali (33,3% dei casi), la frutta a guscio (26%) i molluschi (22%), le uova (16%) ed il latte (9.8%). Le proteine del latte e delle uova risultano gli allergeni più comuni nei soggetti di età inferiore ai 5 anni (9).
Negli ultimi anni i ritiri di prodotti dal mercato contaminati da allergeni o con etichette non conformi alla direttiva 2003/89/CE, sono aumentati drasticamente. In contrasto i dati relativi all'incidenza di allergeni non dichiarati in etichetta in matrici alimentari di origine animale, risultano carenti.
Sebbene i dati preliminari ottenuti nell'indagine conoscitiva voluta dall'Area Sanità Veterinaria della Regione Lazio, siano incoraggianti, appare opportuno, in considerazione della carenza di dati in merito, dell'impatto socioeconomico e delle conseguenze sanitarie anche gravi, proseguire il monitoraggio previsto dal PRIC. Fermo restando la ricerca degli allergeni di cui sopra, potrebbe essere interessante estendere la ricerca a sostanze come il glutine, verso la quali le allergie o, nello specifico, le intolleranze, risultano in aumento nella popolazione (1, 10).

BIBLIOGRAFIA

1. Yun J1, Katelaris CH2 (2008). Food allergy in adolescents and adults. Internal Medicine Journal-"Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1445-5994.2009.01967.x
2. Direttiva 2003/89/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 10 novembre 2003 che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari.
3. Decreto Legislativo n. 114 dell'8 febbraio 2006 Attuazione delle direttive 2003/89/CE, 2004/77/CE e 2005/63/CE in materia di indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari
4. Direttiva 2006/142/CE: Direttiva della Commissione, del 22 dicembre 2006, che modifica l'allegato III bis della direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio concernente l'elenco degli ingredienti che devono essere citati in ogni caso sull'etichettatura dei prodotti alimentari
5. Determinazione D1166 del 17/03/2008: Piano regionale integrato dei controlli 2008-2010 sulla sicurezza alimentare, il benessere e la sanità animale (approvazione degli allegati tecnici relativi ai piani di controllo dell'Area di Sanità Veterinaria).
6. Ghinelli Italo (1985)."Le carni conservate" Volume I° edizione Piccin
7. Kummeling I, Mills EN, Clausen M, Dubakiene R, Pérez CF, Fernández-Rivas M, Knulst AC, Kowalski ML, Lidholm J, Le TM, Metzler C, Mustakov T, Popov T, Potts J, van Ree R, Sakellariou A, Töndury B, Tzannis K, Burney P. (2009). The EuroPrevall surveys on the prevalence of food allergies in children and adults: background and study methodology. Allergy 2009 DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.02046.x
8. E. N. C. Mills, A. R. Mackie,P. Burney, K. Beyer, L. Frewer,C. Madsen, E. Botjes,R. W. R. Crevel, R. van Ree (2007). The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. Allergy 2007: 62: 717–722
9. Fernández Rivas M (2009) Food allergy in Alergológica-2005 J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19 Suppl 2:37-44
10. Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekela I, Patrikainen H, Valve R, Maki M, Collin P (2009). Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: A population-based study. BMC Gastroenterol. 2009 Jun 29;9(1):49.

L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE : ISOELETTROFOCALIZZAZIONE ED ELETTROFORESI CAPILLARE, DUE TECNICHE DIAGNOSTICHE A CONFRONTO.

Campagna M.C., Bucci E., Bottalico N., Nardoni A., Muratore G., Cavallina R.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

KEY WORDS: pesci, isoelettrofocalizzazione, elettroforesi capillare.

SUMMARY
In order to implement the identification procedure of fishery products, two electrophoresis methods have been compared. A further aim of this study was to wide an archive, such as a database, collecting several standard electrophoresis tracks as a reference for the detection of those seafood species whose identification is uncertain.

INTRODUZIONE
La globalizzazione dei mercati e la conseguente crescente importazione di prodotti ittici, ha imposto una particolare attenzione ai rischi connessi al loro consumo. Infatti tali prodotti sono commercializzati sempre più spesso come filetti, bocconcini, tranci etc., rendendo difficile il riconoscimento della specie di appartenenza in base alle caratteristiche morfologiche. Pertanto, le frodi dovute a sostituzione di specie, possono determinare problemi non solo di carattere economico-commerciale ma anche di tipo sanitario, legati alle caratteristiche della zona di provenienza, eventuali trattamenti tossici, presenza di specie allergeniche, etc. E' risultato quindi necessario il ricorso a tecniche di laboratorio che costituiscano non solo un valido supporto tecnico-scientifico ai fini dei controlli ufficiali, ma anche uno strumento di garanzia per il consumatore, in ottemperanza, peraltro, di quanto previsto dalle normative comunitarie in materia di sicurezza alimentare e rintracciabilità dei prodotti ittici (Reg. CE 104/2000, Reg. CE 2065/2001, Reg. UE 178/2002). In Italia il D.M. 27/03/02 e le successive modifiche, "Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo" ,definiscono l'elenco delle denominazioni delle specie ittiche di interesse commerciale (Allegato A).(1)

MATERIALI E METODI
Nel 1995 la FDA ha dichiarato ufficiale, come metodo di identificazione delle specie ittiche, la Focalizzazione Isoelettrica (IEF), creando un database contenente gli standard elettroforetici di 56 specie ittiche maggiormente commercializzate nei mercati statunitensi.
In Italia, dal 1982, la Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano utilizza la metodica dell'IEF per l'identificazione delle specie ittiche commercializzate nei mercati italiani ed europei. E' considerata uno dei metodi più idonei e adeguati per l'identificazione della maggior parte delle specie ittiche commercializzate, allo stato crudo, in Italia e quindi utilizzata per stabilire la conformità con quanto dichiarato in etichetta sulla confezione di prodotti ittici. Consente l'estrazione delle proteine dal tessuto muscolare dei pesci ed è attendibile nel 99% dei casi in esame. Essa presenta numerosi vantaggi quali la semplicità di esecuzione, l'elevata risoluzione e riproducibilità, la creazione di librerie aggiornabili di numerose specie, maggiori polimorfismi interspecifici, rispetto a polimorfismi intra-specifici, che hanno permesso una chiara distinzione , la comparazione con banche dati straniere e ha come campo applicativo principalmente pesce crudo e congelato, in tranci e filetti.
L'elettroforesi capillare zonale (CZE) rappresenta un importante progresso tecnico nel campo dell'elettroforesi. Le separazioni dipendono dalle differenze nelle proprietà elettriche tra gli analiti, fornendo profili proteici facilmente differenziabili ed interpretabili rispetto a quelli delle elettroforesi convenzionali. Ulteriori vantaggi sono rappresentati dalla piccola quantità di campione richiesto, dalla elevata efficienza, dal basso consumo di reagenti e capillari, dall'utilizzo di mezzi acquosi che comportano i costi e impatto ambientale ridotti.(2) Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare due diverse tecniche elettroforetiche usate per l' identificazione di specie nel settore ittico attraverso l'ampliamento del database dei tracciati specie-specifici in IEF e la messa appunto del metodo in elettroforesi capillare zonale (CZE). La fase preliminare ha riguardato il reperimento delle specie ittiche di interesse commerciale e più oggetto di frode e la successiva identificazione anatomo-morfologica. Poi si è proceduti con la messa a punto del metodo in elettroforesi capillare zonale e infine sono state eseguite le analisi per l'ampliamento dei rispettivi database per esemplari appartenenti alla stessa famiglia. I pesci analizzati in questo lavoro provengono dal mercato ittico di Guidonia e sono stati identificati tramite criteri morfologici da un Medico Veterinario esperto nel settore. Complessivamente sono state analizzate 60 specie diverse per un totale di 100 campioni. Sia il metodo IEF che l'elettroforesi capillare zonale prevedono una fase preliminare di estrazione delle proteine muscolari e la loro determinazione secondo il metodo di Lowry. Successivamente, con l'IEF, i campioni sono seminati su gel e sottoposti alla focalizzazione isoelettrica. Terminata la corsa, il gel viene fissato, colorato e acquisito con il densitometro e i tracciati ottenuti vengono elaborati con uno specifico software. Con l'elettroforesi capillare, invece, i campioni sono processati secondo il metodo sviluppato e messo a punto in questo studio, con lo sviluppo di uno specifico elettroferogramma identificativo per ogni specie.(3)

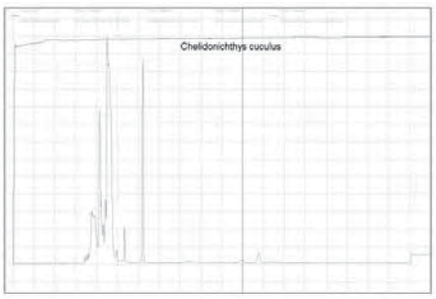
RISULTATI

ESEMPI DI IDENTIFICAZIONE :

GALLINELLA O CAPPONE
Genere - specie:C*helidonichthys cuculus*

Tracciato IEF

Elettroferogramma GALLINELLA

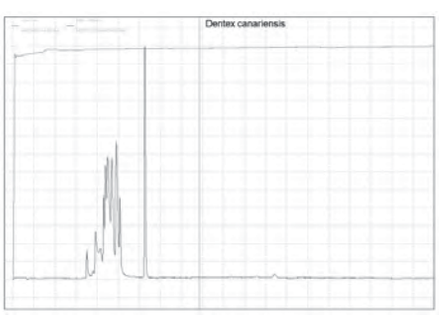


DENTICE ATLANTICO

Genere - specie:*Dentex canariensis*

Tracciato IEF

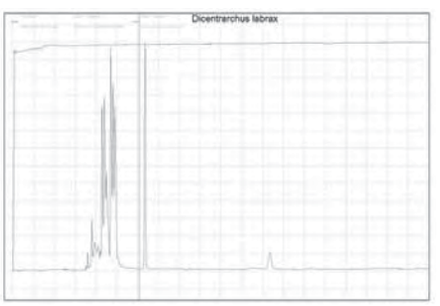
Elettroferogramma DENTICE



In conclusione osservando sia i tracciati isoelettroforetici che l'elettroferogramma di ogni esemplare si può constatare che sono specie-specifici di quella determinata specie in quanto dai risultati ottenuti si può osservare:
1) Differenti numero di bande significative e il range di distribuzione delle bande nel gradiente di pH per quanto riguarda i tracciati IEF di ogni singola specie;
2) Ogni elettroferogramma (CZE) specifico per la specie presenta un numero di picchi ben definito caratterizzati da uno specifico tempo di ritenzione.

Genere - specie: *Dicentrarcus labrax*

Tracciato IEF



Quindi è possibile individuare e confrontare con metodi analitici esemplari appartenenti a specie diverse in quanto presentano profili elettroforetici diversi (CZE) per numerosità di picchi e per modalità di distribuzione in base al loro tempo di ritenzione e, per quanto riguarda il tracciato IEF, per n° di bande significative e per range di distribuzione di quest'ultime nel gradiente di pH.
Ciò ha permesso di costruire una mappa proteica caratteristica per ogni esemplare analizzato appartenente ad una specifica specie ittica.

BIBLIOGRAFIA

1.A. Perezzani, M. Zambon, L. Fasolato, V. Tepedino, G. Arcangeli
"Identificare il pesce in modo sicuro. La corretta nomenclatura e la banca dati delle principali specie ittiche oggetto di consumo, identificate con metodo isoelettrico ". Anno 2008 pag. 3-7.
2. Skoog/Leary, Edit. "Chimica Analitica Strumentale", 2000 pag 974-975.
3. O. Portanti, G. Urbani, F. Biancifiori
" Identificazione di specie ittiche mediante elettroforesi capillare " Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Teramo – Italia pag. 17.

CAMPIONAMENTO SUCCESSIVO AD UN FOCOLAIO UMANO DI TRICHINELLOSI

Careddu M.E. [1], Ribero A.[1], Bianchi C.[1], Motta A.[2]

1Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Sez. Cuneo
2 ASL CN1

Keywords: trichinella, wild boar, foodborne disease

SUMMARY
In the month of April 2009 following a human case of trichinellosis was carried out an investigation to trace the source of the infested food.
The incriminated food was the meat of wild boar from the hunting season 2008/2009.
Samples of meat and salami analyzed by acid-pepsin digestion revealed Trichinella spp. larvae, then identified as Trichinella britovi.

INTRODUZIONE
La trichinellosi è una zoonosi che si trasmette tramite il consumo di carni crude o poco cotte contenenti larve del nematode Trichinella.
Questo nematode è in grado di infestare un gran numero di mammiferi, uccelli e rettili. Tra i mammiferi sono colpiti prevalentemente gli onnivori e i carnivori .
I processi di affumicatura, salatura, essiccamento o cottura nel forno a microonde non sono metodi sicuri per la sanificazione delle carni e ciò spiega il perché della segnalazione di numerosi focolai di trichinellosi a seguito del consumo di insaccati o altri prodotti a base di carne.
Il consumo di alimenti considerati a rischio dovrebbe avvenire solo se sono stati effettuati i controlli sanitari che ne sanciscono l'idoneità al consumo umano o se si sono applicati idonee procedure di prevenzione.
Nel mese di aprile 2009 a seguito di un caso umano di trichinellosi è stata eseguita un'indagine per il rintraccio della fonte di alimento infestata.
L'alimento incriminato è risultata essere la carne di cinghiale proveniente da battute di caccia della stagione venatoria 2008/2009.
Gli esami effettuati hanno portato al rilevamento di carne tal quale e lavorata (salami) con larve di *Trichinella britovi.*

MATERIALI E METODI
Il servizio veterinario territorialmente competente ha partecipato all'indagine, in collaborazione con il S.I.A.N. (Servizio Igiene Alimenti e Nutrizione), conseguente ad un episodio di malattia a trasmissione alimentare (MTA). A seguito di un percorso a ritroso sul probabile periodo di ingestione del parassita l'ultimo bimestre 2008 è risultato essere il periodo incriminato.
Dapprima, quindi, si è campionata la carne conservata nel congelatore della paziente (sposata con un cacciatore), la carne presente era stata meticolosamente impacchettata e congelata con scritta la data delle giornate di caccia
Sono stati inviati i campioni di 3 diverse giornate venatorie dei mesi di novembre e dicembre.
Dopo le prime analisi è emerso che la carne infestata apparteneva al capo/i abbattuti nella data del 23 novembre 2008.
In tornate successive sono stati recuperati presso il domicilio dei diversi cacciatori campioni riferiti alla battuta collettiva del 23 novembre2008 e sono stati consegnati alla sezione di Cuneo 22 sacchetti contenenti tagli di carne di cinghiale congelata in pezzi o trasformata in salami per essere sottoposta ad analisi.
I campioni di carne(16), suddivisi in pezzi di dimensioni variabili (da 2 a 700 grammi), sono stati soggetti a campionamento con pesate da 5 grammi (meno per pezzi inferiori) cadauno, dopo aver asportato le parti di grasso o connettivo, al fine di esaminare ogni pezzo come se fosse appartenente ad un soggetto potenzialmente diverso.
Per i pezzi di grandi dimensioni il campionamento è stato effettuato in diversi punti e con pesate ripetute.
I campioni di salame (6) sono stati privati dello spago e dell'involucro e, per quanto possibile, dei cubetti di grasso. La carne è stata messa in sacchetti per omogenizzazione con soluzione fisiologica in rapporto 1:1 per consentire un ammorbidimento del tessuto muscolare e conservati per 12-24 ore (a seconda della stagionatura) a 4°C.
Per ognuno sono stati fatti prelievi in più punti e pesate ripetute .
La metodica utilizzata è quella della digestione automatica per campioni aggregati fino a 35 grammi (Trichomatic 35®) come da Regolamento CE 2075/05 Allegato 1 capitolo 2 lettera C .
I filtri di digestione e quelli del ciclo a vuoto sono stati osservati al microscopio ottico con ingrandimento 10X.
E' stato effettuato un conteggio delle larve presenti sul filtro.
I filtri con larve sono stati inseriti in provette contenenti 30 ml di etanolo al 90% ed inviati al centro di referenza presso l'Istituto Superiore di Sanità per essere sottoposti ad una multiplex PCR per la tipizzazione del nematode.
Dopo il prelievo dei parassiti, i liquidi positivi (succhi digestivi, liquido surnatante, liquido di risciacquo, ecc.) sono stati decontaminati mediante riscaldamento ad una temperatura minima di 60 °C, i portafiltri decontaminati con immersione in alcool.

RISULTATI
Dei 22 campioni esaminati 4 sono risultati positivi, 3 campioni di carne ed 1 di salame.
Il conteggio delle larve eseguito ha dato valori tra 6 larve/grammo(209 in 35 grammi) a 10 larve/grammo (354 in 35 grammi).
Le larve di trichinella sono state identificate come *Trichinella britovi.*

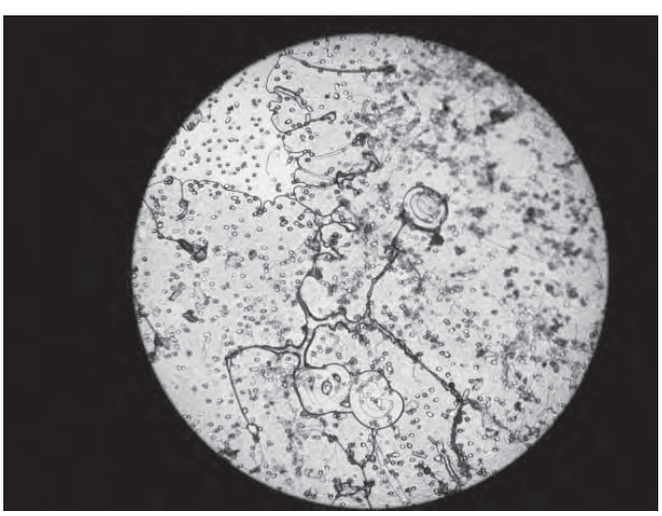


Foto 1: Larve di trichinella su membrana filtrante, M.O. 10X

DISCUSSIONE

A livello analitico il salame è risultato problematico da analizzare.

Sebbene fosse stato preparato con accortezza prima della digestione, il materiale presenta una percentuale di grasso notevole che determina una difficoltà nella lettura della membrana filtrante (eccesso di sedimento).

Il digestore (Trichomatic 35®) inoltre necessita di più cicli di risciacquo prima di essere riutilizzato dopo tale digestione. Per la seconda membrana filtrante derivante dal ciclo a vuoto la lettura è stata più agevole, ma ovviamente, le larve contate sono state poche, nell'ordine di una decina.

Questo elemento può essere rischioso in quanto si potrebbero generare dei falsi negativi proprio per l'impossibilità di lettura dopo il normale ciclo di digestione.

E' importante fare pesate ripetute per la non omogeneità del materiale rispetto alla carne tal quale.

CONCLUSIONI

Le analisi effettuate hanno confermato come la carne di cinghiale sia stata la fonte alimentare del focolaio di trichinellosi per l'uomo.

Il controllo regolare dei suini domestici, dei cinghiali, dei cavalli e delle volpi o di altri animali, qualificati come indicatori, costituisce un importante strumento di valutazione dell'evoluzione della prevalenza della contaminazione .

Il campionamento previsto da piani di monitoraggio regionali consente di stimare la prevalenza del ciclo silvestre di Trichinella nella popolazione dei selvatici, ma per tutelare la salute di chi consuma la carne di cinghiale è fondamentale il controllo di ogni singola carcassa.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dr. Pozio del Laboratorio di Riferimento per la Trichinellosi dell'Istituto Superiore di Sanità.

BIBLIOGRAFIA

1. European Community (2005a). - Regulation (EC) No 2075/2005 of the European Parliament and of the Council of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for Trichinella in meat. Off. J. EC, L 338, 60-82

2. FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis Editors J. Dupouy-Camet & K.D. Murrell Published by: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) World Health Organization (WHO) World Organisation for Animal Health (OIE)

3. Gamble H.R., Bessonov A., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Nöckler K., Schenone H. & Zhu X. (2000). - Recommendations on methods for the control of Trichinella in domestic and wild animals intended for human consumption. Vet. Parasitol., 93, 393-408.

4. Guideline for the detection of trichinella larvae at the slaughterhouse or connected laboratory in a quality assurance system- December 2006-ISS

5. Kapel C.M.O., Webster P. & Gamble R. (2005): - Muscle distribution of sylvatic and domestic Trichinella larvae in production animals and wildlife. Vet. Parasitol., 132, 101-105.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATO DA LATTE E PRODOTTI LATTIERO CASEARI: STUDIO FENOTIPICO E BIOMOLECOLARE

Cataleta A.[1], Crisetti E.[1], Latorre L.[1],Normanno G.[2], Chiocco D.[1],La Salandra G.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia; [2] Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Bari.

Key words: *Staphylococcus aureus,* antimicrobico-resistenza, biotipizzazione

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is considered to be one of the leading causes of food-born illnesses. Milk, dairy products and meats are often contaminated with enterotoxigenic strains of this bacterium.

The number of *S.aureus* strains that exhibits antimicrobial-resistence properties has incresead, together with the potential risk of transmitting the same properties to the human microflora via foods or inducing infection hard to be treated.

This study reports the results of characterization of 700 *S.C.P* isolated from milk and dairy products produced in Italy. The 250 strains of *S.aureus* isolates were characterized in order to determine the staphylococcal enterotoxin(s) (SEs) production by multiplex PCR, the antibiotic-resistance profile and the ecological origin of the strains by biotyping.

INTRODUZIONE

Nell'ambito della sicurezza alimentare l'interesse verso *Staphylococcus aureus*, non risiede solo nella sua capacità di sintetizzare negli alimenti contaminati tossine termostabili e quindi agenti di intossicazione alimentare, ma anche nella valutazione del rischio legato alla capacità di *S. aureus* di sviluppare resistenze ai più diffusi antibiotici.

S. aureus è un microrganismo ubiquitario e circa il 50% dei ceppi è capace di causare sintomatologia gastroenterica nell'uomo in quanto produttore di enterotossine stafilococciche (4). Le enterotossine (SEs) sono un gruppo di esoproteine termostabili e resistenti alla pepsina con peso molecolare variabile da 26 a 31 KD. Tradizionalmente sono conosciuti cinque tipi antigenici classici: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (3). Recentemente sono state identificate "nuove" SEs: da SEG a SEP, SEQ e SEU ma il loro ruolo nelle tossinfezioni alimentari non è ancora chiaro (13). L'antibiotico resistenza acquisita da un numero sempre crescente di ceppi risulta essere un problema rilevante per la salute pubblica; *S. aureus* ha mostrato infatti pattern di multi resistenze, probabilmente acquisite anche a causa dell'impiego improprio di antibiotici (11).

Lo scopo del nostro studio è stato quello di:

1) valutare la presenza di *S. auerus* in campioni lattiero-caseari;

2) caratterizzare gli isolati sulla base della produzione di enterotossine e sul profilo di antibiotico-resistenza;

3) biotipizzare i ceppi e mettere in relazione i risultati ottenuti con quelli menzionati precedentemente.

MATERIALI E METODI

Per lo svolgimento di questo lavoro sono stati esaminati 700 ceppi di SCP (Stafilococchi coagulasi positivi) isolati da latte, e prodotti lattiero-caseari, in campioni commercializzati nella regione Puglia e nella regione Basilicata nel periodo 2004-2008.

L'isolamento di SCP dalle matrici alimentari è stato eseguito secondo la norma EN ISO 6888 1-2 1999 che prevede l'utilizzo del terreno *Baird Parker RPF Agar* (Biolife). I ceppi di *S. aureus* sono stati identificati con l'utilizzo del terreno chromagar (Chromagar).

Il DNA dei singoli isolati è stato poi estratto con bollitura.

Ciascun ceppo è stato sottoposto a multiplex PCR per la rivelazione di 12 geni specifici per le enterotossine stafilococciche quali **sea, seb, sec, seh, sej sed, see, seg, sei sem, sen** e **seo** seguendo i protocolli modificati di diversi autori **(**1, 5, 6, 7, 12)

La biotipizzazione è stata eseguita sui ceppi di *S. aureus* produttori di enterotossina con il metodo descritto da Devriese (2).

L'antibiotico-resistenza è stata valutata con il metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer) secondo le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards (8, 9, 10). Ogni ceppo è stato testato nei confronti di 16 antibiotici a concentrazioni prestabilite e classificato sensibile, intermedio o resistente al dato antibiotico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 700 isolati di *S. aureus* presi in esame, 250 (35.7%) sono risultati enterotossigeni; in particolare 107 ceppi (42.8%) erano produttori di una singola tossina, 85 (34%) di due tossine, 38 (15.2%) di tre tossine, 7 (2.8%) di quattro tossine, 9 (3.6%) di cinque tossine e 4 (1.6%) di sei (Tab. 1). La tossina maggiormente espressa dai ceppi di *S.aureus* (sia singolarmente che in associazione) era SEA (121-48.4%) seguita da SED (115-46%), SEC (70 -28%), SEB (41 -16.4),SEG (22 -8.8%).

Tra i 250 ceppi enterotossigeni 89 (35.6%) appartenevano al biotipo NHS (non ospite specifico), 74 (29.6%) al biotipo umano, 52 (20.8%) al biotipo ovino, 19 (7.6%) a quello bovino e 9 (3.6%) al biotipo poultry-like. Pochi ceppi di *S. aureus* enterotossigeni non sono stati identificati nei biotipi studiati (Tab. 2).

Nelle prove di antimicrobico-resistenza 44 ceppi (17.6%) erano resistenti ad un antibiotico, 44 ceppi (17.6%) a due, 45 (18%) a tre, 30 (12%) ad almeno quattro.

Gli antibiotici maggiormente interessati nel fenomeno della resistenza erano penicillina (PG), ampicillina (AP), seguiti da eritromicina (E), tetraciclina (T), Sulfametoxazolo-trimethoprim (SXT), novobiocina (NO), enrofloxacina (ENF), gentamicina (GM), bacitracina (BA), streptomicina (S) e Kanamicina (K). Nessun ceppo è risultato essere resistente a vancomicina (VA), teicoplanina (TC), meticilina (MT), oxacillina (OX) e cefalotina (KF) (Tab 2).

La percentuale di stipiti multiresistenti conferma che gli alimenti di origine animale rimangono comunque una importante fonte di antibiotico-resistenza in *S. aureus*.

L'analisi dei dati ha rivelato che la percentuale di ceppi che erano resistenti a due o più antibiotici era significativamente più alta nel biotipo umano che in tutti gli altri biotipi.

Questi dati, così come riportato in letteratura sembrano confermare che la contaminazione da *S. aureus* nei prodotti lattiero-caseari è legata soprattutto all'igiene delle manipolazioni e alla sanità degli allevamenti con particolare riguardo alle mastiti sub-cliniche.

BIBLIOGRAFIA

1) Boerema, J.A., Clemens, R., Brightwel, G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food

isolates of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology, 107, 192-201.
2) Devriese, L.A. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. Journal of Applied Bacteriology. 1, 56(2):215-20.
3) Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Revievs, 13, 16-34.
4) Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Poggiu, A., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Normanno, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V. (2003). *Staphylococcus aureus* in alimenti di origine animale, presenza e caratterizzazione enterotossica. Industrie alimentari- XLII 613-616.
5) Jarraud, S., Mougel, C., Thiolouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infection and Immunity, 70, 631-641.
6) Løvseth, A., Loncarevic, S., Berdal, K.G. (2004). Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 42, 3869-3872.
7) Monday, S.R., Bohach, G.A. (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 37, 3411-3414.
8) National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. CLSI Document M31-A2. Wayne, Pennsylvania.
9) National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Document M100 S16. Wayne, Pennsylvania.
10) National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Document M2-A9.Wayne, Pennsylvania.
11) Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V. (2007). Occurence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiolology. 20,115(3):290-6.
12) Rosec, J.P., Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. International Journal of Food Microbiolology, 77, 61-70.
13) Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel C., Stephan R. (2004). Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology, 101, 101-107.

Si ringraziano per la preziosa collaborazione tecnica i Sigg. Angelo Mantuano e Lorenzo Rignanese

Lavoro svolto con i fondi RC del Ministero della Salute, IZS*PB 004/06.*

Tab. 1: Rate of positive S. aureus by PCR assay against 1 or more se genes

Positive strains (%)	Toxin number					
	One	Two	Three	Four	Five	Six
Total 250	107 (42.8)	85 (34)	38 (15.2)	7 (2.8)	9 (3.6)	4 (1.6)

Tab. 2: Relationship between biotype and antimicrobial resistance properties in the analysed strains

Biotype	N. strains	N. strains MR (%)	N. strains resistano to									
			AP/PG	GM	BA	T	E	ENF	SXT	NO	K	S
HUMAN	74	35 (47%)	37	4	1	27	29	1	15	3	1	1
OVINE	52	8 (15%)	15		3	5	6	1	9	2	1	1
BOVINE	19	8 (42%)	9	1	1	4	6		3	2		1
POULTRY-LIKE	9	4 (44%)	3			3	3	2	3	2		
NHS	89	13 (14%)	31			9	8	2	10	2		2
PROFILE UNIDENTIFIED	7	2 (28%)	3			2	1			3		

UTILIZZO DELLA LINEA CELLULARE CACO-2 NELL'ISOLAMENTO DEL VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA: CONFRONTO CON METODICHE STANDARD

Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C., Barigazzi G., Foni E.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Key words: influenza suina, CACO-2, isolamento

SUMMARY
During a swine influenza virus (SIV) monitoring programme, 111 samples were submitted to virus isolation using embryonated chicken eggs (ECE), MDCK cells and CACO-2 cells and 67 SIVs were isolated. The use of CACO-2 cells was able to isolate 100% of H1N1 and H1N2 subtypes, while the isolation rate for H3N2 was 52%. ECE showed to be able to isolate H1N1 in 41%, H1N2 in 9% and H3N2 in 100% of the cases. MDCK cells permitted SIV isolation in 52% of H1N1, 6% of H1N2 and 42% of H3N2.

INTRODUZIONE

I virus influenzali suini circolanti in Italia e in Europa originano da un riassortimento genetico tra virus influenzali aviari ed umani. Nella popolazione suina europea circolano principalmente tre sottotipi del virus Influenza A: H1N1, H1N2, H3N2 (1). E' stata comunque osservata una continua evoluzione del patrimonio genetico di questi virus con comparsa di virus riassortanti o addirittura di nuovi sottotipi (4, 5). Recentemente è stato isolato un nuovo virus influenzale umano A/H1N1 di origine suina (6) che si è dimostrato in grado di superare la barriera di specie causando un episodio di infezione in un allevamento di suini in Canada (7).
Nello studio della circolazione dei virus influenzali suini, l'isolamento virale e le tecniche di identificazione sono fasi talvolta lunghe e indaginose. Si tratta comunque di tappe obbligate in quanto una conoscenza delle caratteristiche antigeniche e genetiche degli isolati rappresenta un punto cruciale per lo studio dell'evoluzione epidemiologica delle infezioni influenzali e in particolare per il monitoraggio di una eventuale trasmissione del virus tra specie diverse. L'isolamento del virus influenzale in uova embrionate (UE) è considerato un metodo standard, tuttavia anche le colture cellulari si sono dimostrate un sistema di isolamento e coltivazione alquanto affidabile. In particolare è diffuso l'utilizzo della linea cellulare MDCK (8). I virus influenzali di tipo A hanno differente comportamento nella crescita in vitro a seconda del ceppo e a seconda delle affinità per i recettori cellulari coinvolti nell'infezione. Recentemente la linea cellulare CACO-2 originata da epitelio di colon intestinale umano, è risultata suscettibile all'infezione da parte di virus influenzali umani H3N2 e H1N1, anche da campioni clinici, senza l'aggiunta di tripsina nel terreno (9). Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'utilizzo della linea CACO-2 nell'isolamento di virus influenzali suini H1N1, H1N2, H3N2, a confronto con i risultati ottenuti dall'inoculazione di UE e colture cellulari MDCK.

MATERIALI E METODI

Nel periodo dall'anno 2006 ai primi mesi del 2009, nell'ambito di un programma di monitoraggio della circolazione del virus influenzale suino sono stati controllati 145 allevamenti suini localizzati in aree ad alta densità di popolazione suina del nord Italia. Nel corso delle indagini condotte sono stati diagnosticati 49 focolai di malattia respiratoria causata da virus influenzale suina. La diagnosi è stata ottenuta tramite applicazione di metodica biomolecolare RT-PCR (3) applicata a pool di campioni di polmoni e/o tamponi nasali provenienti dai sospetti focolai.
Dai pool di campioni risultati positivi tramite metodica RT-PCR, sono stati selezionati 111 campioni originali, rappresentati sia da estratti polmonari che da tamponi nasali che sono stati sottoposti contemporaneamente a prove di isolamento virale su UE, colture cellulari MDCK e colture cellulari CACO-2. I campioni di tessuto e i tamponi sono stati omogeneizzati in PBS con antibiotici e inoculati in UE SPF di 10 giorni di età. Il substrato cellulare MDCK è stato coltivato in placche a 24 pozzetti, 0,2 ml del campione omogenato filtrato è stato inoculato in cinque repliche a ciascuna delle quali sono stati aggiunti 0,2 ml di MEM contenente tripsina (10µg/ml). Le colture cellulari CACO-2 sono state propagate in piastre da 24 pozzetti in MEM con sodio piruvato (1mM). 0,2 ml di campione omogenato filtrato sono stati inoculati in cinque repliche sul monostrato di CACO-2 e 0,2 ml di MEM con 1mM di sodio piruvato sono stati aggiunti. A cinque giorni circa dopo l'infezione i liquidi allantoidei e i sovranatanti delle colture cellulari infettate sono stati raccolti e sono stati testati per la presenza di virus influenzale tramite test di emoagglutinazione e test ELISA per la ricerca della nucleoproteina A. I campioni risultati negativi sono stati sottoposti a un secondo passaggio. I virus influenzali isolati sono stati sottoposti a caratterizzazione antigenica tramite inibizione dell'emoagglutinazione usando un pannello di antisieri di referenza e tramite multiplex RT-PCR (2) per la tipizzazione dell'emoagglutinina e della neuroaminidasi. I risultati sono stati analizzati usando il test esatto di Fisher.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dai 145 focolai di infezione influenzale sono stati isolati 67 ceppi virali (17 H1N1, 31 H1N2, 19 H3N2). Tutti gli stipiti H1N1 17/17 e 31/31 H1N2 sono stati isolati da substrato cellulare CACO-2 anche se un passaggio seriale si è reso necessario nel 50% dei casi. In particolare 26/31 dei ceppi di H1N2 si sono dimostrati in grado di replicare esclusivamente sul substrato CACO-2 con una differenza statisticamente significativa (test Fisher $p<0,01$) rispetto ai dati di isolamento su cellule MDCK e UE. Utilizzando le UE è stato possibile isolare 7/17 H1N1, 3/31 H1N2 19/19 H3N2 e quasi in tutti i casi l'isolamento è stato ottenuto al primo passaggio. L'utilizzo delle UE ha permesso di isolare in modo statisticamente significativo più sottotipi H3N2 che nei sistemi cellulari ($p<0.01$). Il substrato cellulare MDCK ha dimostrato di fornire una percentuale di isolamento più bassa rispetto ai due sistemi, per esempio 9/17 H1N1 e 2/31 H1N2, 8/19 H3N2 (tab. 1). La tabella 2 mostra i valori percentuali di isolamento del virus influenzale suino usando i tre sistemi di rilevazione, valutati da soli o variamente combinati con gli altri due. E' stato possibile isolare il 100% dei virus influenzali H1N1 e H1N2 usando solamente le colture cellulari CACO-2 mentre su questo substrato l'isolamento del sottotipo H3N2 è stato possibile solo nel 52% dei casi. L'uso contemporaneo di UE e colture cellulari CACO-2 si è dimostrato in grado di permettere l'isolamento del 100% dei virus influenzali responsabili dei focolai di malattia respiratoria nel suino.
Il substrato cellulare CACO-2 si è dimostrato particolarmente

sensibile all'infezione da parte del virus influenzale suino, confermando le osservazioni ottenute nello studio sui virus influenzali umani (9,10). Grazie all'elevato numero di osservazioni condotte è stato possibile osservare un legame tra il sottotipo virale considerato e il tropismo cellulare. I virus H1N1 hanno mostrato una percentuale di isolamento maggiore nel substrato cellulare CACO-2 a confronto con i risultati ottenuti applicando gli altri due sistemi. L'isolamento del sottotipo virale H1N2 è stato fortemente influenzato dall'uso delle cellule CACO-2 e l'uso combinato di MDCK e UE non ha portato a un miglioramento della percentuale di isolamento. Per quanto riguarda il sottotipo virale H3N2 la percentuale più alta di rilevamento si è ottenuta usando le UE. Quindi alla luce della scarsa suscettibilità del substrato CACO-2 all'infezione da parte del sottotipo virale H3N2, si dimostra essenziale l'utilizzo simultaneo dei due sistemi di rilevamento, CACO-2 e EU, al fine di essere in grado di isolare tutti i tre sottotipi attualmente coinvolti nelle infezioni da virus influenzale del suino. Ulteriori e più approfonditi studi genetici degli isolati potrebbero aggiungere ulteriori dettagli esplicativi e potrebbero contribuire a spiegare i differenti comportamenti dei sottotipi dei virus influenzali sui vari substrati di isolamento.

Tabella 1. Numero dei virus influenzali isolati in UE, CACO-2 e MDCK. (I)primo passaggio. (II) secondo passaggio

	UE I	UE II	CACO-2 I	CACO-2 II	MDCK I	MDCK II
H1N2	3	0	16	15	1	1
	3		31		2	
H1N1	6	1	9	8	4	5
	7		17		9	
H3N2	18	1	9	1	7	0
	19		10		8	

Tabella 2. Percentuali di isolamento dei sottotipi H1N1, H1N2, H3N2 tramite i tre differenti substrati considerati da soli (a,c) o variamente combinati (d-g)

	(a) CACO-2	(b) MDCK	(c) UE	(d) CACO-2 + MDCK	(e) CACO-2 + UE	(f) MDCK + UE	(g) CACO-2 + MDCK + UE
H1N1	17/17 (100%)	9/17 (52%)	7/17 (41%)	17/17 (100%)	17/17 (100%)	10/17 (58%)	17/17 (100%)
H1N2	31/31 (100%)	2/31 (6%)	3/31 (9%)	31/31 (100%)	31/31 (100%)	5/31 (16%)	31/31 (100%)
H3N2	10/19 (52%)	8/19 (42%)	19/19 (100%)	10/19 (52%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)	19/19 (100%)

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Roberta Manfredi per il supporto tecnico.

Questo lavoro è stato parzialmente finanziato da Progetto ESNIP 2 (SSPE-CT-2005-022749) e da finanziamento ministeriale PRC2005/16

BIBIOGRAFIA

1. Brown, I.H. Epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. Vet Microbiol 74, 29-46
2. Chiapponi, C., Fallacara, F. and Foni, E., 2003. Subtyping of H1N1, H1N2 and H3N2 swine Influenza Viruses by two multiplex RT-PCR. 4th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases PRRS-PMWS-Swine Influenza. , 257-258
3. Fouchier, R.A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G.F. and Osterhaus, A.D., 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J Clin Microbiol 38, 4096-101
4. Karasin, A.I., Olsen, C.W., Brown, I.H., Carman, S., Stalker, M. and Josephson, G., 2000. H4N6 influenza virus isolated from pigs in Ontario. Can Vet J 41, 938-9
5. Moreno, A., Barbieri, I., Sozzi, E., Luppi, A., Lelli, D., Lombardi, G., Zanoni, M.G., Cordioli, P., 2009. Novel swine influenza virus subtype H3N1 in Italy. Vet Microbiol, in press, doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.007
6. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009, N Engl J Med Jun 18. Pp 2605-2615
7. OIE, ed, 2004. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Fifth Edition. Office International des Epizooties , Paris
8. OIE, 2009 WAHID Weekly Disease Information. Vol 22-No 19, 7 May 2009
9. Zhirnov and Klenk, 2003 Virology 313, 198-212
10. Zhirnov et al., 2007. Biochemistry (Mosc) 72, 398-408.

PIANO NAZIONALE RESIDUI – TEST ISTOLOGICO: L'ESPERIENZA DI UN ANNO NELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

Cocumelli C., Eleni C., Aquilini E., Sala M., Scaramozzino P.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411, 00178 – Roma

Key Words: Piano Nazionale Residui, Istologia, Anabolizzanti

SUMMARY
From January 2008 the histological examination of target organs for the evaluation of illicit use of growth promoter has been included in the Residues National Plan (RNP), mainly for its higher sensitivity compared to the analytical method. The histological plan was based on the evaluation of sexual glands, thyroid and thymus of batch of calves and cattle sent to slaughtering. According to the official classification 8.5% of the batches resulted "suspected" and 37.2% were "doubtful". Sexual steroids in calves were the most frequent finding.

INTRODUZIONE
Nella Unione Europea ed in Italia sono da tempo in vigore norme riguardanti il divieto di utilizzo di sostanze ad azione anabolizzante nelle produzioni animali (D.Lgs. 158/2006, recepimento della direttiva 2003/74/CE). Nonostante ciò continuano ad essere segnalati, anche se con una frequenza minore rispetto al passato, episodi di utilizzo fraudolento di molecole ad azione ormonale e ad azione beta-agonista (1). I corticosteroidi attualmente sembrano essere diventati il gruppo più importante fra le sostanze usate come promotori di crescita (2). Le capacità analitiche dei laboratori, attualmente caratterizzate da limiti di rilevazione molto bassi, risultano comunque inadeguate nel caso vengano utilizzate nuove molecole, oppure molecole già note siano somministrate in combinazione a sostanze ad attività analoga o sinergica. L'esame istologico, dal 2008, fa parte integrante del Piano Nazionale Residui (PNR) con l'obiettivo di ovviare, in parte, ai limiti di sensibilità delle metodiche chimiche. La valutazione delle alterazioni anatomoistopatologiche in organi bersaglio di bovini regolarmente macellati consente infatti di mettere in evidenza trattamenti riconducibili all'impiego illecito di promotori di crescita, in maniera indipendente dalla molecola utilizzata, e per tutta la durata della vita commerciale dell'animale. Nel presente lavoro si riportano i risultati relativi alle analisi effettuate presso il laboratorio di anatomoistopatologia dell'IZSLT, sui campioni prelevati nell'ambito del Piano Regionale Residui (PRR) 2008 delle Regioni Lazio e Toscana.

MATERIALI E METODI
Il campionamento è stato pianificato in due stadi. Al primo livello è stata determinata la numerosità campionaria delle partite di animali da macello, considerando una prevalenza massima attesa pari a 5% ed un livello di confidenza del 95%. Il numero di partite da campionare in tal modo calcolate (N=59) è stato poi stratificato per ASL in funzione del numero di macelli e del volume di macellazione. Secondariamente, all'interno delle singole partite, è stato stabilito il numero di capi da esaminare per escludere la presenza di trattamento illecito, considerando una prevalenza attesa pari a 50% ed una sicurezza del 95%. Le categorie di età degli animali da sottoporre a prelievo erano vitelli (≤ 8 mesi) e vitelloni (9-24 mesi). Per ogni singolo capo si è proceduto al prelievo di timo e tiroide per la ricerca rispettivamente di lesioni riferibili a trattamenti con cortisonici e tireostatici; per gli steroidi sessuali, molecole che riconoscono come bersaglio le ghiandole annesse all'apparato riproduttore, gli organi prelevati erano diversi in funzione di sesso e categoria dell'animale (Tab. 1). Le indagini istopatologiche sono state effettuate secondo le tecniche diagnostiche di routine.

Organi / Mesi	Maschi		Femmine	
	≤8	9-24	≤8	9-24
Timo	X	X	X	X
Tiroide	X	X	X	X
Prostata	X	X	--	--
Ghiandole bulbo-uretrali	X	X	--	--
Ghiandole del Bartolino	--	--	X	--
Ovaio	--	--	X	--
Mammella	--	--	X	--

Tab. 1 – Organi da prelevare in funzione della categoria animale secondo il PNR.

Il giudizio sulle partite (negativo, dubbio, sospetto), è stato assegnato seguendo le indicazioni fornite dalla scheda di valutazione allegata al PNR, in funzione degli esiti ottenuti sugli animali testati per ogni partita.
I confronti tra le prevalenze osservate in funzione della regione di macellazione, Regione di provenienza e delle categorie d'età dei soggetti sono stati operati mediante il test statistico per la differenza tra proporzioni per campioni indipendenti. La significatività è stata valutata per $p<0,05$. Le elaborazioni dei dati sono state effettuate utilizzando il software statistico STATA/SE v.9.0.

RISULTATI
Nel corso del 2008 sono state campionate 129 partite, 62 nel Lazio e 67 in Toscana, per un totale di 303 capi, di cui 71 dichiarati non idonei per campionamento non conforme. In base al PNR, le partite cui appartenevano i capi non idonei sono state escluse nel loro complesso da successive valutazioni (n=35), riducendo il campione valido a 94 partite per un totale di 214 capi. Gli esiti per partita, indipendentemente dalla classe di sostanza, sono riportati in tabella 2.

ESITO	REGIONE		
	Totale	Lazio	Toscana
Negativo	***51*** (54,3%) (0,44;0,65)	**15** (39,5%) (0,24;0,57)	**36** (64,3%) (0,50;0,77)
Dubbio	***35*** (37,2%) (0,27;0,48)	**17** (44,7%) (0,29;0,62)	**18** (32,1%) (0,20;0,46)
Sospetto	***8*** (8,5%) (0,04;0,16)	**6** (15,8%) (0,06;0,31)	**2** (3,6%) (0,00;0,12)
Totale	***94***	***38***	***56***

Tab. 2 – Prevalenze dei giudizi sulle partite con relativi intervalli di confidenza al 95%, suddivise per regione di macellazione.

Le partite sospette provenivano da Lazio (4), Veneto (3) e Piemonte (1), mentre quelle dubbie da Toscana (16), Lazio (12) e da altre regioni (7). La proporzione di partite sospette risulta significativamente superiore tra quelle macellate ed analizzate nel Lazio ($p=0,0372$). Considerando come criterio di classificazione la Regione di provenienza delle partite (Lazio o Toscana) ed escludendo quelle di provenienza da altre regioni, la proporzione

di partite sospette è risultata superiore tra quelle provenienti dal Lazio (p=0,0109). Gli esiti delle partite divise per classi di sostanze sono riportati in tabella 3. La classe di sostanze più frequentemente ritenuta responsabile di alterazioni istologiche è quella degli steroidi sessuali (n=33, 35,1%, IC=0,255;0,456); le partite risultate sospette e dubbie per lesioni compatibili con l'uso di cortisonici sono 17 (18,1%, IC=0,11;0,27). Per 7 partite (7,4%, IC=0,03;0,15) l'esito è risultato dubbio e/o sospetto per steroidi sessuali e per cortisonici.

SOSTANZA	ESITO	REGIONE	
		Lazio	Toscana
Steroidi sessuali	Negativo	**17** *(44,7%)* (0,29;0,62)	**44** *(78,6%)* (0,66;0,88)
	Dubbio	**16** *(42,1%)* (0,26;0,59)	**11***(19,6%)* (0,10;0,32)
	Sospetto	**5** *(13,2%)* (0.04;0,28)	**1** *(1,8%)* (0,00;0,09)
Cortisonici	Negativo	**34** *(89,5%)* (0,57;0,97)	**43** *(76,8%)* (0,64;0,87)
	Dubbio	**3** *(7,9%)* (0,02;0,21)	**12** *(21,4%)* (0,12;0,34)
	Sospetto	**1** *(2,6%)* (0,00;0,14)	**1** *(1,8%)* (0,00;0,09)
Totale		**38**	**56**

Tab. 3 – Prevalenze dei giudizi sulle partite con relativi intervalli di confidenza al 95% suddivise per regione di macellazione e per classe di sostanze

Non sono state rilevate invece lesioni compatibili con l'uso di tireostatici.
L'analisi per sostanza evidenzia una prevalenza maggiore di partite dubbie e sospette per steroidi sessuali tra quelle macellate nel Lazio rispetto alla Toscana (p<0,05). Anche in questo caso, considerando come criterio di classificazione la regione di provenienza delle partite, il Lazio ha mostrato una proporzione di partite sospette significativamente superiore rispetto alla Toscana per steroidi sessuali. L'analisi relativa ai cortisonici non ha evidenziato differenze significative sia in base alla sede di macellazione sia in funzione della regione di provenienza delle partite.
Dei 214 capi, 56 (26,2%, IC=0,20;0,33) sono risultati dubbi e 15 (7,0%, IC=0,04;0,11) sospetti per cortisonici o steroidi sessuali; 6 soggetti (2,8%, IC=0,01;0,06) sono risultati dubbi ad entrambe le molecole (Tab.4).

SOSTANZA	ESITO	REGIONE	
		Lazio	Toscana
Steroidi sessuali	Negativo	**53** *(60,23%)* (0,49;0,70)	**86** *(82,69%)* (0,74;0,89)
	Dubbio	**23** *(26,14%)* (0,17;0,37)	**17** *(16,35%)* (0,10;0,25)
	Sospetto	**12** *(13,64%)* (0,07;0,23)	**1** *(0,96%)* (0,00;0,05)
	Totale	**88**	**104**
Cortisonici	Negativo	**87** *(94,56%)* (0,88;0,98)	**103** *(84,43%)* (0,08;0,90)
	Dubbio	**4** *(4,35%)* (0,01;0,11)	**18** *(14,75%)* (0,09;0,22)
	Sospetto	**1** *(1,09%)* (0,00;0,06)	**1** *(0,82%)* (0,00;0,04)
	Totale	**92**	**122**

Tab. 4 – Prevalenze dei giudizi sui capi con relativi intervalli di confidenza al 95% suddivise per regione e per classe di sostanze.

Analizzando i dati per categoria di età, nella classe dei vitelli si evidenzia una maggiore prevalenza dei sospetti per steroidi sessuali (p<0,001), mentre la differenza osservata nelle prevalenze di giudizio di sospetto per cortisonici tra le classi di età non risulta statisticamente significativa (Tab. 5).

SOSTANZA	ESITO	Classe età	
		≤8	9-24
Steroidi sessuali	Negativo	**2** *(5,8%)* (0,01;0,20)	**116** *(64,4%)* (0,57;0,71)
	Dubbio	**16** *(47,1%)* (0,30;0,65)	**63** *(35,00%)* (0,28;0,42)
	Sospetto	**16** *(47,1%)* (0,30;0,65)	**1** *(0,6%)* (0,00;0,03)
Cortisonici	Negativo	**34** *(100,00%)* (0,90;1,00)	**133** *(73,9%)* (0,67;0,80)
	Dubbio	**0** *(0,00%)* (0,00;0,10)	**40** *(22,2%)* (0,16;0,29)
	Sospetto	**0** *(0,00%)* (0,00;0,10)	**7** *(3,9%)* (0,02;0,08)
Totale		**34**	**180**

Tab 5. – Prevalenze dei giudizi sui capi con relativi intervalli di confidenza al 95% suddivise per età e per classe di sostanze

DISCUSSIONE

Nonostante i dati relativi alle attività condotte nel 2008 non consentano di fornire evidenza diretta di uso di sostanze illecite, i risultati osservati suggeriscono come l'utilizzo dei promotori di crescita nell'allevamento bovino da carne possa tuttora persistere nelle regioni Lazio e Toscana. Le molecole sospettate con maggiore frequenza sono gli steroidi sessuali, in particolare nella categoria dei vitelli. I tireostatici, benché molto utilizzati in passato, sembrano essere attualmente in disuso fra i trattamenti illeciti, probabilmente per la facilità di emissione di sospetto già durante la visita *post-mortem*.
Rispetto a quanto osservato da Busia e coll. (3) in Sardegna, la proporzione di soggetti sospetti per trattamento con promotori di crescita evidenziati nel presente lavoro risulta essere inferiore. I nostri risultati invece concordano con lo stesso autore riguardo alla maggiore frequenza di uso di steroidi sessuali nella classe dei vitelli.
I dati ottenuti confermano che il test istologico è un valido ausilio nella lotta contro l'utilizzo illegale di promotori di crescita, poiché si è dimostrato in grado di rilevare una prevalenza di partite sospette di trattamento pari all' 8,5%, a fronte di una sporadica segnalazione di non conformità ufficiali nell'ambito del PNR. L'uso dell'esame istologico nell'ambito dei Piani di sorveglianza in sanità pubblica sarebbe quindi in grado di segnalare ai Servizi veterinari eventuali situazioni di sospetto di trattamento, e di indirizzare in modo più mirato ed efficace l'azione di sorveglianza. Ovviamente, trattandosi di metodi non riconosciuti giuridicamente, in caso di sospetto, rimane necessario il ricorso al prelievo ufficiale e la conseguente analisi chimica.

BIBLIOGRAFIA

1) Serratosa J, Blass A, Rigau B, Mongrell B, Rigau T, Tortadès M, Tolosa E, Aguilar C, Ribó O, Balagué J. (2006) Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective. Rev Sci Tech. 2006 Aug;25(2):637-53..

2) Courtheyn D.; Le Bizec B.; Brambilla G.; De Brabander H.F.; Cobbaert E.; Van de Wiele M.; Vercammen J.; De Wasch K. (2002) Recent developments in the use and abuse of growth promoters. Analytica Chimica Acta, Volume 473, N. 1, 25 November 2002, pp. 71-82(12).

3) Busia G., Anfossi A., Appino S., Melillo R., Mazzette R., Leoni A. (2007) Individuazione di lesioni attribuibili all'utilizzo illecito di promotori di crescita In bovini macellati in Sardegna. IV Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria, p. 67-68.

BASIC FRAGMENT ANALYSIS PER LA DETERMINAZIONE DEL SESSO NEI VOLATILI

Colussi S.[1], Peletto S.[1], Riina M.V.[1], Zuccon F.[1], Maniaci M.G. [1], Trisorio S.[1], Mignone W.[2], Fornasiero M.[1], Fragassi S.[1], Marengo S.[3], Caramelli M.[1], Acutis P.L.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino.
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Imperia.
[3] Veterinario libero professionista, Fossano – Cuneo.

Key words: sessaggio, PCR, volatili.

SUMMARY – The aim of this work is to describe the basic fragment analysis as detection system to improve the PCR used for bird sex determination. The classical method based on the detection of the PCR products (alleles in avian male and female are characterized by different length) using a 3% agarose gel is not completely effective. In fact some species can not be sexed because the small differences in the length of the alleles are not distinguishable in gel. Our system is quick and simple, allowing to determine the exact size of the alleles, specific for each species.

INTRODUZIONE – La determinazione del sesso nei volatili basata su elementi morfologici e comportamentali non risulta sempre attendibile; in alcune specie infatti il maschio e la femmina appaiono indistinguibili ad un'analisi visiva (specie monomorfiche).
In questi casi è pertanto necessario ricorrere a tecniche sicure, ma estremamente invasive quali quelle laparoscopiche. Una valida alternativa è rappresentata dalla Polymerase Chain Reaction (PCR) applicabile partendo dal calamo delle piume quale matrice. La metodica, efficace in centinaia di specie aviarie, si basa sull'amplificazione del gene Chromobox Helicase DNA binding domain 1 (CHD1). Questo gene ubicato sui cromosomi sessuali (ZZ nel maschio e ZW nella femmina) presenta, infatti, due forme alleliche caratterizzate da una differente lunghezza; l'allele associato al cromosoma sessuale Z generalmente presenta dimensioni inferiori rispetto all' allele associato al cromosoma W, ad eccezione di alcune specie nelle quali si verifica il fenomeno opposto (1). Ciò consente pertanto, applicando un sistema di rivelazione su gel di agarosio al 3%, di visualizzare una sola banda per gli individui di sesso maschile e due bande per quelli di sesso femminile.
Questo sistema si è rivelato efficace per alcune specie, mentre per altre, nelle quali i due alleli differiscono soltanto per poche paia di basi, non è stato possibile discriminare tra i due sessi; in tal caso sarebbe necessario procedere mediante rivelazione su gel di poliacrilammide.
Alcuni ricercatori hanno inoltre ovviato a tale problema adottando tecniche diverse, quali la Real Time PCR (2), che hanno però richiesto un lavoro di ricerca di primers adatti allo scopo differenti da quelli classicamente proposti da Griffiths *et al.* (1).
In questo lavoro, la metodica utilizzata è la PCR descritta da Griffiths *et al*., ma viene presentato un metodo di rivelazione alternativo basato sull'analisi di frammenti, che consente la determinazione del sesso nella gran parte dei volatili (Neognati). Un caso a parte è rappresentato dagli struzzi (Paleognati) i quali presentano due alleli del gene CHD1di ugual dimensione per un percorso evolutivo differente, che rende inefficace la metodica di PCR (3).

MATERIALI E METODI – Sono stati analizzati 37 campioni di tessuto nella fase iniziale di messa a punto della tecnica di PCR e 20 costituiti da calami di piume. I campioni testati erano di sesso noto (determinato per via chirurgica o per via bio-molecolare presso laboratori esterni); in tabella 1 sono riportate la numerosità campionaria e la specie di appartenenza.
L'estrazione è stata effettuata utilizzando il kit Nucleospin tissue (Macherey-Nagel) partendo da circa 25 mg di tessuto o dal calamo di 2-5 piume, in base alle dimensioni del calamo stesso. La PCR è stata effettuata utilizzando i primers P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') descritti da Griffiths *et al*, (1); il primer P2 è stato marcato in 5' con il fluorocromo Hex per consentire la successiva analisi di frammenti quale sistema di rivelazione. La PCR è stata eseguita su un volume di reazione pari a 10µl contenente: 1.5U di HotStarTaq Qiagen, 1.5 mM di Mg^{2+}, 300 nM di ciascun primer e 0.2 mM di ciascun nucleotide; 50-60 ng di DNA genomico sono stati utilizzati come templato. Il ciclo di PCR prevedeva una fase iniziale di attivazione della Taq polimerasi a 95°C per 15' seguita da 40 cicli a 95°C per 30'', 48°C per 30'', 65°C per 60'' e un'estensione finale di 65°C per 5'.
L'amplificato PCR è stato diluito generalmente 20 - 30 volte ed 1 µl è stato utilizzato in una mix contenente il marcatore di peso molecolare ROX (GeneScan – 500 Rox Size Standard – Applied Biosystems) e formammide. Questa miscela è stata denaturata a 96°C per 2' e sottoposta ad apposita corsa elettroforetica per analisi di frammenti mediante sequenziatore automatico (3130 Genetic Analyser – Applied Biosystems). I campioni sono stati analizzati con l'ausilio del software Genemapper.

RISULTATI E DISCUSSIONE – In tutti i campioni analizzati la metodica è risultata attendibile. In tabella 2 è riportata la lunghezza specifica degli alleli per le specie in cui è stato possibile analizzare sia individui di sesso femminile sia maschile. Di seguito viene invece riportata la lunghezza caratteristica della banda di maschi appartenenti a differenti specie: tacchino (341 pb); gallo forcello (333 pb); pernice (361pb); piccione selvatico (368 pb); aquila e poiana (380 pb); nibbio (379 pb); falco (399 pb); gheppio (401 pb); sparviero (383 pb); allocco (361 pb); è stato inoltre esaminato un esemplare di assiolo femmina (361 pb; 376 pb).
Le figure 1 e 2 mettono a confronto i risultati ottenuti applicando la metodica di rivelazione alternativa qui descritta e la metodica classica su gel di agarosio partendo dalla stessa PCR. Per la rivelazione su gel sono stati scelti il gufo e l' inseparabile come esemplificativi rispettivamente di un caso in cui il gel non consente un corretto sessaggio, poiché i due alleli differiscono di sole 8 pb, e di un caso in cui invece risulta efficace poiché vi è una maggiore differenza (30 pb).
L'analisi di frammenti, di facile e rapido impiego, consente a differenza dei sistemi tradizionali, di essere applicata indistintamente alle varie specie aviarie a prescindere dalla differenza di lunghezza tra le due varianti alleliche.
Inoltre questa metodica consente di definire le differenze alleliche in modo preciso, caratteristico per ciascuna specie e di ovviare al problema di eventuali cross-contaminazioni.
Tale tecnica richiede, peraltro, una quantità molto piccola di amplificato (1µl) consentendo di lavorare con ridotti volumi di PCR. Una corretta attribuzione dei due sessi si ottiene anche

in caso di un'esigua quantità di prodotto PCR a differenza della classica rivelazione su gel di agarosio.
In conclusione l'impiego della PCR associata a questo sistema è risultata un'attendibile ed incruenta alternativa per la determinazione del sesso nelle specie aviarie monomorfiche o con un moderato dimorfismo sessuale.

BIBLIOGRAFIA –

1) Griffiths R., Double M.C:, Orr K., Dowson R.J.G. (1998). A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology, 7: 1071-1075.
2) Chang H-W, C-A Cheng, D-L Gu, C-C Chang, S-H Su, C-H Wen, Y-C Chou, T-C Chou, C-T yao, C-L Tsai, C-C Cheng. (2008). High-throughput avian molecular sexing by SYBR green-based real-time PCR combined with melting curve analysis. BMC Biotechnology 8: doi:10.1186/1472-6750-8-12.
3) Garcia-Moreno J., Mindell D.P. (2000). Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs): a case study using avian CHD.

Tabella 1: numerosità e specie analizzate

Ordine	Famiglia	Specie (Nome comune)	N° campioni
Galliformes	*Phasianidae*	Gallo, Gallo forcello, Pernice	11
Galliformes	*Meleagrididae*	Tacchino	2
Columbiformes	*Columbidae*	Piccione selvatico	1
Accipitriformes	*Accipitridae*	Aquila, Poiana, Nibbio	11
Accipitriformes	*Falconidae*	Falco, Gheppio	2
Falconiformes	*Accipitridae*	Sparviero	1
Strigiformes	*Strigidae*	Gufo, Civetta, Assiolo, Allocco	7
Strigiformes	*Tytonidae*	Barbagianni	3
Psittaciformes	*Cacatuidae*	Calopsitte	2
Psittaciformes	*Psittacidae*	Inseparabile	17

Tabella 2: determinazione della lunghezza delle due varianti alleliche

Specie (Nome comune)	Femmina	Maschio
Gallo	345 pb 361 pb	345 pb
Gufo	365 pb 373 pb	365 pb
Civetta	365 pb 375 pb	365 pb
Barbagianni	362 pb 384 pb	362 pb
Calopsitte	372pb 401 pb	372 pb
Inseparabile	369 pb 399 pb	369 pb

Figura 1: Determinazione del sesso in due soggetti (gufo) rispettivamente femmina e maschio mediante analisi di frammenti

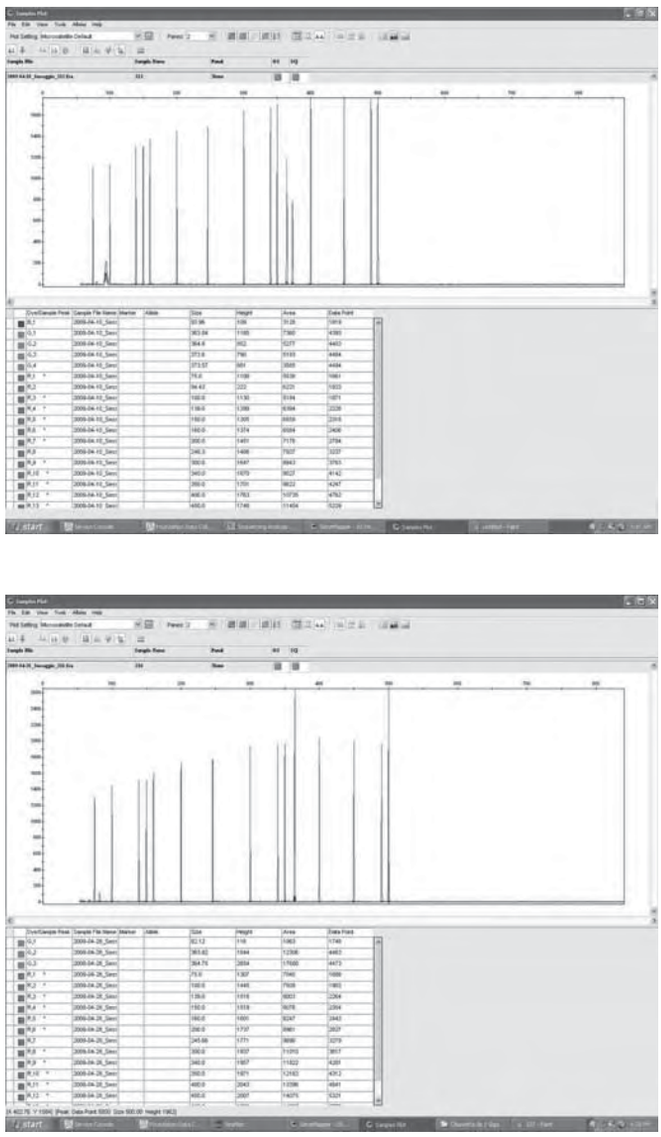
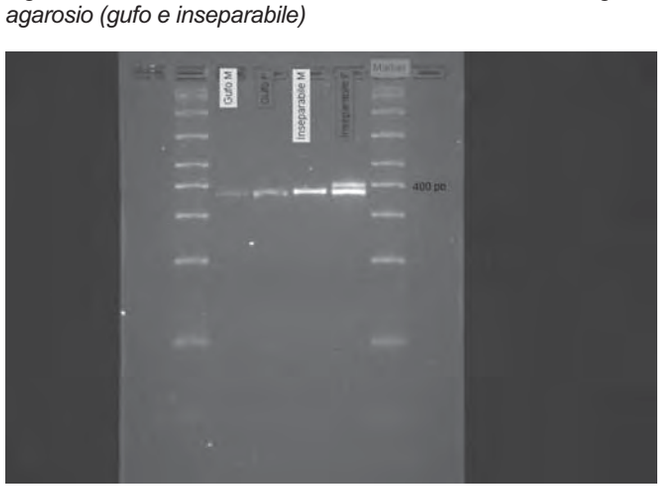


Figura 2: Rivelazione di individui maschio e femmina su gel di agarosio (gufo e inseparabile)



DISTRIBUTORI PER LA VENDITA DIRETTA DI LATTE CRUDO E SICUREZZA DEI CONSUMATORI NELLA REGIONE VENETO

Comin D., Mioni R., Paiusco A., Bordin P., Grimaldi M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura Complesssa1- Microbiologia Alimentare – Legnaro (PD)

Keywords: latte crudo; distributori; igiene

ABSTRACT
Regulation (EC) 853/2004 authorizes the direct sale of raw milk from the producer to the final consumer.
Between 2007 and 2008 more than 440 raw milk official samples were analysed at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Food Microbiology Laboratory to estimate their hygienic characteristics. All samples were collected from vending machines located in the Veneto Region (Italy). One sample was positive for *Salmonella spp.*, and 1 showed a high count for coagulase positive staphylococci; none of the samples was positive for *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157 and thermo-tolerant *Campylobacter*.

INTRODUZIONE
La vendita diretta di latte crudo dal produttore al consumatore è stata autorizzata ai sensi del Regolamento (CE) n. 853/2004. A livello nazionale il riferimento normativo è il Provvedimento di Intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano del 25 gennaio 2007 in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana. La Regione Veneto aveva precedentemente regolamentato il settore con la D.G.R.V. n. 2950 del 11.10.2005 , riportante "Linee guida per la vendita di latte crudo dal produttore agricolo al consumatore finale", che differisce dall'Intesa nel merito di alcuni limiti di riferimento (più restrittivi per tenore in germi e cellule somatiche), nel numero di unità campionarie da testare (5 solo per gli stafilococchi coagulasi positivi) e in quanto non prevede la ricerca di *E. coli* O:157) (Tabella 1 e 2). La delibera regionale è stata successivamente modificata con i decreti della giunta regionale n. 510 del 4 dicembre 2008 e n°18 del 17 febbraio 2009, ma a tutt'oggi rappresenta ancora a livello regionale lo strumento normativo di riferimento.
Nella regione Veneto sono attualmente in funzione circa 200 distributori, il cui numero è in costante aumento; tuttavia, la diffusione di questa tipologia di prodotto pone alcune problematiche igienico-sanitarie. Il latte crudo è infatti definito come latte prodotto mediante secrezione della ghiandola mammaria di animali di allevamento che non è stato riscaldato a più di 40°C e non è stato sottoposto ad alcun trattamento avente un effetto equivalente; pertanto, in assenza di trattamenti termici, esso mantiene inalterata la flora microbica derivante dallo stato sanitario della mammella e dall'igiene della mungitura. Il mantenimento della catena del freddo e la sanificazione di cisterne e distributori automatici costituiscono ulteriori punti critici da un punto di vista igienico-sanitario. Vengono di seguito riportati i risultati delle analisi microbiologiche svolte in sede di controllo ufficiale su campioni di latte crudo prelevati presso distributori per la vendita diretta al consumatore negli anni 2007-2008.

MATERIALI E METODI
I campioni sono stati prelevati dal servizio veterinario ufficiale ed esaminati presso il Laboratorio di Microbiologia Alimentare dell'IZS delle Venezie per i parametri microbiologici indicati nella D.G.R.V. n. 2950/05 (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes, Salmonella* spp. e *Campylobacter* termotolletanti) (Tabella 1); non sono stati riportati i risultati per il tenore in germi a 30°C poiché la conformità viene valutata su più analisi consecutive. Le metodiche analitiche utilizzate (Tabella 2) sono basate su norme ISO, ad eccezione della ricerca dei *Campylobacter* termofili (metodo interno accreditato).

RISULTATI
Sono stati esaminati 70 campioni nel 2007, e 342 nel 2008; i risultati sono riportati in Tabella 3. Le analisi hanno evidenziato 1 campione non conforme per la presenza di *Salmonella spp*., ed 1 per la presenza di stafilococchi coagulasi positivi in carica superiore al limite consentito (M=2000). Nessun campione è risultato positivo per *Campylobacter* termofili e per *Listeria monocytogenes*.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
Il latte crudo rappresenta una importante risorsa nutrizionale per il consumatore e un'opportunità commerciale per il produttore che può raggiungere nuove nicchie di mercato con investimenti contenuti; dai risultati preliminari ottenuti emerge un profilo microbiologico del prodotto nella Regione Veneto abbastanza rassicurante. Tuttavia, poiché questa particolare tipologia di prodotto non prevede necessariamente prima del consumo un trattamento termico di bonifica da parte dell'utilizzatore finale, è elevato il rischio che i microrganismi patogeni eventualmente presenti possano originare focolai tossinfettivi nel consumatore finale. I dati sperimentali e di letteratura indicano difatti che, seppure sporadicamente e, verosimilmente, in bassa carica, il latte crudo prelevato dai distributori automatici può essere contaminato da microrganismi patogeni di varia natura (*E. coli* O157, *Campylobacter* termofili, *Salmonella spp*., *Coxiella burnetii*, ecc.) Ciò deve indurre gli operatori del settore all'applicazione rigorosa di protocolli di autocontrollo che garantiscano elevati standard sanitari degli animali, una elevata igiene della mungitura, un'accurata sanificazione delle attrezzature, un rigido mantenimento della catena del freddo e deve spingere le autorità sanitarie a consolidare la vigilanza sanitaria da parte del Controllo Ufficiale. Il latte crudo è un bene alimentare prezioso, gradito al consumatore per le sue qualità organolettiche e nutrizionali, ma che deve essere gestito con competenza tecnica e consapevolezza delle possibili problematiche sanitarie correlate al suo consumo. A titolo precauzionale, non ne è consigliabile il consumo da parte dei consumatori più a rischio (bambini, donne in gravidanza, anziani, ammalati, soggetti a vario titolo immunodepressi) se non previa bollitura o comunque adeguato trattamento termico.

BIBLIOGRAFIA
1. Regolamento della Commissione 2073/2005/CE del 15 novembre 2005 - GU L 338 del 22/12/2005
2. Regolamento (CE) 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale
3. DGRV n. 2950 del 11.10.2005 riportante "Linee guida per la vendita di latte crudo dal produttore agricolo al consumatore finale"
4. Provvedimento di Intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana – 25 gennaio 2007

TABELLA 1: Criteri previsti dalla D.G.R.V. n. 2950 del 11.10.2005 per la vendita di latte crudo bovino

ricerca	valore	frequenza
Tenore in germi a 30°C (per ml)	≤ 50.000 (media geometrica su 3 mesi)	Almeno 2 al mese
Titolo di cellule somatiche (per ml)	≤ 300.000 (media geometrica su 3 mesi)	Almeno 1 al mese
Staphylococcus aureus (per ml)	m=500, M=2000, n=5, c=2	Mensile
Listeria monocytogenes	Assenza /25 g	Mensile
Salmonella spp.	Assenza /25 g	Mensile
Campylobacter	Assenza /25 g	Mensile
Aflatossina M1	≤ 50 ppt	Mensile

TABELLA 2: metodi analitici

parametro	metodica
Staphylococcus aureus	ISO 6888-2:1999/Amd 1 2003
Listeria monocytogenes	ISO 11290-1:1996/Amd 1 2004
Salmonella spp.	ISO 6579:2002/Cor. 1 2004:(E)
E.coli O157	ISO 16654:2001
Campylobacter termofili	Metodo interno validato

TABELLA 3: risultati

Parametro	risultati			
	2007		2008	
	analisi	positivi	analisi	positivi
Staphylococcus aureus	308	0	336	**1 (0,3%)**
Listeria monocytogenes	320	0	342	0
Salmonella spp.	310	0	342	**1 (0,3%)**
Campylobacter termofili	308	0	339	0
E.coli O157	11	0	195	0

CONTROLLO SANITARIO DEI MOLLUSCHI BIVALVI NELLA REGIONE SICILIA: MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO, CHIMICO E BIOTOSSICOLOGICO

Costa A.[1], Cardamone C.[1], Alio V.[1], Grippi F.[1], Napoli C.[1], Vella A.[1], Nifosì D.[2]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri" Palermo*

[2]*Assessorato Regionale alla Sanità Dipartimento Attività Sanitaria ed Osservatorio Epidemiologico- Ufficio VIII Palermo*

Key words: bivalve molluscs, microbiological and chemical analysis, sanitary control

SUMMARY

The authors report results of microbiological, chemical and biotoxicological examinations carried out on 537 edible lamellibranch molluscs samples in the period January 2006-June 2009: 516 samples were drawn from production and relaying areas and 21 from commercialization centres of Sicily. Value of *Escherichia coli* more than of limit fixed by Regulation (EC) No. 1441/2007 were found on 8 samples of mussels (1.8%). Two strains belonging to Salmonella (*Salmonella caracas* and *Salmonella rissen*) were isolated in mussels. *Vibrio parahaemolyticus*(n.7)and *Vibrio alginolyticus* (n.11) were found in 18 samples. 14 samples were found positive to PSP biotoxins. Chemical analysis did not revealed organohalogenates and heavy metals in all samples tested.

INTRODUZIONE

E' noto come i molluschi bivalvi, organismi filtratori per eccellenza, possano rappresentare un potenziale veicolo di agenti infettivi e tossici (1,2,5). Le attuali normative comunitarie e nazionali ne fissano i requisiti igienico sanitari applicabili sia alla produzione che all'immissione sul mercato (Reg CE 853 e 854/2004, Reg CE 1441/2007); in particolare le aree di produzione e di stabulazione classificate dei molluschi bivalvi vivi devono essere monitorate periodicamente al fine di verificarne la qualità microbiologica, la presenza di contaminanti chimici nonché l'eventuale presenza di plancton tossico nelle acque e di biotossine nei molluschi, con provvedimenti di rapida chiusura delle aree di allevamento e blocco delle partite al commercio in caso di non conformità. In Sicilia il commercio dei molluschi bivalvi si basa sulla vendita del prodotto vivo e fresco di provenienza sia nazionale (in particolare dall'Alto e Medio Adriatico) che estera (Grecia e soprattutto Spagna); prima di essere immessi al commercio, tali prodotti vengono avviati ai centri di depurazione/spedizione (CDM/CSM) presenti in particolare nella provincia di Messina e, in seguito, a pescherie, mercati ittici, esercizi di somministrazione. Tali passaggi rendono il prodotto, tra l'altro facilmente deperibile, particolarmente suscettibile a contaminazioni microbiologiche durante le varie fasi della filiera (confezionamento, trasporto, commercio). Il settore della molluschicoltura ha inoltre avuto un incremento negli ultimi anni in Sicilia con la classificazione e apertura degli impianti di Siracusa (mitili) e di Licata (ostriche); altri impianti sono in sperimentazione (vongole Messina, ostriche Trappeto). Scopo del presente lavoro è stato quello di raccogliere i risultati degli esami microbiologici, chimici e biotossicologici effettuati negli ultimi 3 anni presso i nostri laboratori, nell'ambito del controllo ufficiale, al fine di valutare la qualità igienico sanitaria e la salubrità dei molluschi bivalvi destinati al consumo,

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra gennaio 2006 e giugno 2009 sono stati esaminati 537 campioni di molluschi eduli lamellibranchi (M.E.L.) freschi, con prevalenza di mitili o cozze (*Mytilus galloproviancialis)* (n. 448), seguiti da ostriche (*Ostrea edulis*) (n. 80) e vongole (*Tapes philippinarum*) (n. 9) per la ricerca di parametri batteriologici, biotossine algali e contaminanti chimici. I campionamenti sono stati effettuati dai servizi veterinari delle AUSL delle provincie siciliane nell'ambito del controllo sanitario dei molluschi bivalvi vivi sia presso gli impianti di produzione e di stabulazione (in prevalenza) che presso esercizi commerciali e di somministrazione (Tab 1). **Analisi microbiologiche**: ricerca di *Salmonella spp* (ISO 6579:2002), identificazione biochimica API 20E (Bio Merieux), conferma sierologica (antisieri DIFCO); numerazione di *E coli* -metodo MPN (ISO/TS 16649-3:2005): ricerca di *Vibrio spp* (ISO/TS 21872-1:2007), identificazione biochimica API 20NE (Bio Merieux); **Biotossine algali**: biotossine liposolubili (Diarrhetyc Shellfish Poison -DSP) e idrosolubili (Paralytic Shellfish Poison-PSP) metodo biologico-inoculazione intraperitoneale nel topo (D.M.16/05/2002-GU n. 165 del 16/07/2002); acido domoico (Amnesic Shellfish Poison-ASP) metodo HPLC-cromatografia liquida ad alta prestazione.
Analisi chimiche: ricerca di metalli pesanti Mercurio, Cadmio e Piombo (Assorbimento atomico), PCB non diossina simili (GC/ECD), IPA- Idrocarburi Policiclici Aromatici (GC/MS)

Tab 1 n. campioni esaminati e provenienza gennaio 2006-giugno 2009

provenienza	n. campioni esaminati
Impianti miticoltura Porto Grande Siracusa	147
Impianti stabulazione mitili- CSM Lago Torre Faro Messina	287
Allevamento ostriche Licata	80
Allevamento vongole ME	2
Mitili commercializzazione	10
Mitili somministrazione	4
Vongole commercializzazione	7
Totale	537

RISULTATI

Nelle tabelle successive (Tab 2 e Tab 3) vengono riportati i risultati microbiologici e biotossicologici divisi per parametro e per tipologia di campione.
Riguardo alla ricerca di *E.coli*, tale parametro è risultato superiore ai limiti di legge, stabilito in 230 MPN/100g di polpa e liquido intravalvale (Reg CE N. 1441/2007), in 8 campioni di mitili campionati presso Centri Spedizione Molluschi (CSM) della provincia di Messina, mitili sottoposti a stabulazione zona Torre Faro-ME,confezionati e pronti per la vendita: il valore più alto di *E.coli* (5400 MPN/100 g) è stato osservato in un campione di mitili provenienti dalla Grecia; negli altri campioni i valori ritrovati andavano da 790 a 3500 MPN/100 g. Un ceppo di *Salmonella rissen* è stato isolato da un campione di mitili prelevato presso una trattoria del messinese mentre un ceppo di *Salmonella caracas* è stato isolato da un campione di vongole fresche, prelevate dall'UVP di Palermo, di provenienza Tunisi, e destinate al commercio.
Riguardo alla determinazione delle biotossine algali, sono stati evidenziati valori di saxitossina (PSP) superiori ai limiti di legge (800 µg/Kg) in 12 campioni di mitili e 1 campione di ostriche nel febbraio 2007 (periodo nel quale era stata segnalata la presenza di alghe tossiche nella zona), e in un campione di

mitili nel 2008, quest'ultimo di provenienza spagnola, prelevati presso gli impianti di miticoltura del Porto di Siracusa: i risultati del *mouse test* da noi eseguiti sono stati confermati dal LNR per le Biotossine Marine di Cesenatico. A seguito di positività per PSP nei campioni di mitili allevati nella zona di Siracusa, sono state adottate una serie di azioni (ordinanza di divieto di raccolta e commercializzazione, blocco delle partite sospette, vigilanza veterinaria sulla filiera locale) intesi ad assicurare una adeguata tutela della salute pubblica. Le indagini biotossicologiche, chimiche e l'analisi del fitoplancton campionato nella medesima zona nel periodo del riscontro della positività, sono stati oggetto di precedenti lavori da noi pubblicati (4). La ricerca delle altre biotossine algali (DSP e ASP) ha dato esito negativo. Sui campioni pervenuti è stata effettuata anche la ricerca di *Vibrio spp* , microrganismo attualmente non inserito nei Reg comunitari sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari: viene comunque evidenziata dalla Comunità Europea la necessità di raccogliere dati sulla diffusione dei ceppi di *Vibrio* potenzialmente patogeni nei prodotti della pesca, con particolare riguardo a *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Nella nostra indagine sono stati isolati n. 11 ceppi di *Vibrio alginolyticus*, ceppo di frequente riscontro nei molluschi bivalvi, il cui ruolo come agente di gastroenteriti è da chiarire, e n. 7 ceppi di *V. parahaemolyticus* da campioni di mitili: la verifica delle proprietà tossigene dei ceppi di *V. parahaemolyticus* isolati, effettuata mediante PCR, (ricerca geni *tdh* e/o *trh*), così come indicato da una nota del Ministero della Salute su parere dell'Istituto Superiore di Sanità (7), è attualmente in corso e sarà oggetto di una prossima comunicazione.

Tab 2 n. campioni esaminati e risultati degli esami microbiologici e biotossicologici

M.E.L.	n. camp.	Sfavorev. *E.coli*	Sfavorev. *Salmonella*	Sfavorev Biotossine algali
Mitili	448	8 (1.8%)	1 (*S. rissen*)	13 (PSP)
Ostriche	80	-		1 (PSP)
Vongole	9	-	1 (*S. caracas*)	
TOTALE	537	8 (1.5%)	2(0.4%)	14 (2.6%)

Tab 3 Risultati Isolamenti e biotossine per sede di prelievo

Prelievo presso	*E.coli*	*Salmonella*	*Vibrio spp*	Biotoss algali
Impianti Mitilicoltura (SR)	-	-	5 *V.parah*. 4 *V. alginolyt*	14 (PSP)
Allevam. ostriche Licata	-	-	1 *V. alginolyt*	-
CSM/ CDM mitili stabulati (ME)	8	-	2 *V.parah*. 5 *V. alginolyt*	-
Esercizi di commercia-lizzazione	-	1 (*S. caracas*)	1 *V. alginolyt*	-
Esercizi di somministra-zione	-	1 (*S. rissen*)		-
TOTALE	8	2	18	14

Riguardo agli esami chimici, non sono stati riscontrati valori di metalli pesanti superiori ai limiti di legge (Reg CE N.1881/2006) né presenza di PCB e di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nei campioni esaminati (valori inferiori ai limiti di rivelabilità) sia alla produzione che al commercio.

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati ottenuti si osserva che i mitili in particolare risultano la matrice alimentare che spesso può essere oggetto di contaminazione sia batteriologica che tossicologica; i dati ottenuti comunque mostrano una percentuale di contaminazione da *E. coli* molto ridotta (1.8%) nei campioni esaminati: in un precedente lavoro (3) si erano osservati valori del 4.4% in mitili prelevati in prevalenza presso CSM: da qui l'importanza del controllo dell'efficacia del risanamento del prodotto prima del frazionamento commerciale. I nostri risultati inoltre confermano la potenziale responsabilità di tale alimento nella diffusione della salmonella, in particolare a livello di commercio e somministrazione, punti critici della filiera alimentare.

Riguardo al riscontro di positività per le biotossine algali, è noto che i molluschi bivalvi vivi possono tra l'altro concentrare sostanze tossiche elaborate dalle alghe; il fenomeno della fioritura algale è in costante aumento negli ultimi anni in varie parti del mondo compresi i nostri mari (1). L'importanza della salvaguardia e della corretta gestione dell'ambiente acquatico, grazie anche all'applicazione delle normative esistenti, riveste pertanto un ruolo essenziale nella prevenzione delle fioriture algali e del conseguente accumulo nei molluschi bivalvi destinati al consumo.

Da non sottovalutare inoltre l'importanza del controllo per la ricerca di Vibrio patogeni responsabili di gastroenteriti. Studi recenti hanno confermato la diffusione di *V parahaemolyticus* nei mari italiani (4,5); dati di letteratura mostrano che la frequenza di ceppi tossigeni isolati dai prodotti ittici risulta essere piuttosto bassa (dall'1% al 3%) (7).

La flora microbica e/o la eventuale presenza di contaminazioni chimiche o tossiche (presenza di fitoplancton tossico) dei prodotti ittici è sicuramente strettamente correlata all'ambiente in cui vivono, ciò in particolare per i molluschi bivalvi, organismi filtratori per eccellenza.

I risultati ottenuti da questa indagine, riferiti agli ultimi 3 anni di monitoraggio sui molluschi bivalvi commercializzati nel nostro territorio, permettono di definire buona la qualità igienico-sanitaria di questi prodotti: è sicuramente importante continuare ad eseguire controlli secondo normativa, al fine di garantire un prodotto salubre ed un elevato livello di protezione per la salute pubblica.

BIBLIOGRAFIA

1) Ade P.,Funari E.,Poletti R. (2003) Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine Ann Ist Super Sanità 39 (1): 53-68

2) Baldini G., Novelli F., Baldini M. (2005) Piombo, cadmio, arsenico e mercurio negli alimenti di origine ittica: livelli di presenza e stima delle assunzioni in Italia e nell'unione europea Rapp. ISTISAN 05/24;53-64

3) Costa A., Cardamone C.,Oliveri G.,Russo Alesi E.M., Di Noto A.M. (2002) Valutazioni sulle caratteristiche microbiologiche e biotossicologiche di molluschi eduli lamellibranchi Atti LVI Conv. Naz. S.I.S.Vet.: 387-388

4) Costa A., Di Noto A.M. Russo Alesi E.M., Alio V., Milandri A. Pompei M. Poletti R.,Giacobbe M.G. Caracappa S.(2007) Presenza di biotossine algali del tipo P.S.P. (Paralytic Shellfish Poison) in mitili allevati nel porto grande di Siracusa Atti LXI Conv. Naz S.I.S.Vet.: 375-376

5) Croci L., Suffredini E. (2003) Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici Ann Ist Sup Sanità; 39 (1); 35-45

6) Masini L.,Bacchiocchi S.,Marangoni V.,Santarelli S., Ottaviani D. (2006) Indagine sulla prevalenza di vibrioni patogeni nei prodotti della pesca e dell'acquacoltura Industrie Alimentari XLV (4); 410-413

7) Ministero della Salute comunicazione Prot. DGVA III del 15/09/2005 –Parere dell'ISS a seguito conclusione del gruppo di lavoro sul *V.parahaemolyticus* nei prodotti della pesca

Ringraziamenti Di Salvo S., Genovese A., Lombardo M., Rizzuto M.L.

MALATTIA VESCICOLARE DEL SUINO: EPIDEMIA IN UMBRIA E MARCHE 2008-2009

Costarelli S. [1], **Biasini G.**[1], **Faccenda L.**[1], **Grazioli S.**[2], **Mariotti C.**[1], **Marchi S.**[1], **Scoccia E.**[1], **Sensi M.**[1], **Maresca C.**[1]
[1]*Istituto Zooprofilatico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche*
[2]*Istituto Zooprofilatico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna*

Key words: MVS, epidemia, Umbria e Marche

SUMMARY
Over the past 15 years, in Umbria and Marche Region (Centre of Italy), swine herds registered a progressive reduction in terms of numbers and, especially in Umbria, a consistent variation of production typologies.
Many breeding herds were converted into weaning, or fattening units; others were organized as "multisite" accomodations. This led to a significant improvement of their health status but, on the other hand, to an increase of critical animals handling.
In October 2008, many Swine Vesicular Disease outbreaks interested both regions. The aim of this work is to describe the epidemiological situation and the activities carried out during the epidemic period.

INTRODUZIONE
Il patrimonio suinicolo delle regioni Umbria e Marche ha subito, negli ultimi 15 anni, una progressiva e drastica riduzione numerica, accompagnata da un sostanziale cambiamento della tipologia produttiva, soprattutto in Umbria. In questa regione molte scrofaie sono state trasformate in unità di svezzamento ed ingrasso nella logica di filiere produttive e di contratti di soccida. Altre scrofaie sono state articolate in strutture "multisede", ai fini dell'ottimizzazione della gestione produttiva e sanitaria dell'allevamento. Tutto ciò, da un lato ha comportato un evidente miglioramento dello stato sanitario della singola unità produttiva, dall'altro ha determinato un aumento delle criticità legate alla movimentazione degli animali.
Gli ultimi episodi di Malattia Vescicolare Suina avevano interessato la Provincia di Perugia nel corso del 2004 comportando l'insorgenza di 2 focolai e l'abbattimento di 4229 capi; un altro focolaio è stato evidenziato nel 2007, nella provincia di Ancona dove sono stati abbattuti 729 capi.
Nell'autunno del 2008, un'importante epidemia di Malattia Vescicolare Suina ha interessato entrambe le Regioni di competenza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.
La malattia è stata evidenziata il 10 di ottobre, nel corso delle normali attività di Sorveglianza (1, 2, 3), in un allevamento da ingrasso del comune di Bettona (PG), zona caratterizzata da elevata densità di allevamenti suinicoli. A seguito di questa positività il 17 ottobre la Provincia di Perugia, perdeva l'accreditamento per MVS.
Il presente lavoro illustra la situazione epidemiologica e le attività svolte durante i periodi epidemici della malattia.

MATERIALI E METODI
Analisi statistica
E' stata compiuta un'analisi descrittiva della situazione epidemiologica della Malattia Vescicolare del suino in Umbria, descrivendo le caratteristiche dell'epidemia (durata ed estensione geografica). I dati disponibili in anagrafe (consistenza di capi, consistenza allevamenti, indirizzo produttivo) sono stati elaborati tramite analisi bivariata al fine di individuare i possibili fattori di rischio che hanno avuto un ruolo determinante nell'epidemia. Sono state considerate significative le variabili con valori di $p \leq 0,05$.
Attività di laboratorio
Onde consentire che l'attività analitica fosse in grado di fronteggiare il massiccio prelievo di campioni dettato dall'emergenza del territorio, la procedura tecnica adottata fino a quel momento (ELISA competitiva metodo OIE), procedura che prevedeva la lavorazione dei campioni in due diluizioni (1/7,5; 1/22,5), è stata sostituita da quella a screening, con una sola diluizione, come suggerito dal Centro di Referenza (4).

RISULTATI E DISCUSSIONI
Il primo focolaio per MVS in Umbria è stato dichiarato il 17 ottobre 2008. Da quella data, per circa 7 settimane, sono stati rilevati numerosi allevamenti infetti per un totale di 30 focolai in Umbria e 6 nella Regione Marche. Nella Tabella 1 sono riportati i focolai primari e secondari che hanno interessato le due Regioni.
I focolai umbri sono stati localizzati tutti in provincia di Perugia, 6 sono risultati focolai primari, 24 focolai secondari; l'ultimo dei 30 focolai è stato rilevato l'ultima settimana di novembre (Figura 1). Sono stati complessivamente abbattuti 6613 capi.
I 6 focolai della Regione Marche erano tutti focolai secondari a quelli umbri: 3 localizzati in provincia di Ascoli Piceno; 2 in provincia di Ancona; 1 in provincia di Pesaro Urbino. Sono stati abbattuti 72 capi.

	N. focolai secondari	N. focolai primari	RCC	RCA	ING	SS	Capi abbattuti
PG	**24**	**6**	**1**	**1**	**25**	**3**	**6613**
AP	**3**				**3**		**55**
AN	**2**				**2**		**13**
PU	**1**				**1**		**4**
TOT.	**36**						**6685**

Tab. 1: Numero dei focolai primari e secondari dell'ondata epidemica 2008, in Umbria e nelle Marche

In data 24 marzo 2009, è stato registrato un ulteriore focolaio (31°) in un allevamento da ingrasso, di 320 capi, sito nel comune di Tuoro sul Trasimeno. Tutti i capi sono stati abbattuti. Questo fatto ha determinato l'obbligo di un ulteriore, massiccio, controllo sierologico in tutte le aziende della Provincia di Perugia, prima di aggiornare la Commissione Europea in occasione del successivo Comitato Veterinario permanente.
Complessivamente, dalla data in cui sono state rilevate le prime positività (10 ottobre 2008) fino al 30 aprile 2009, sono stati sottoposti a test ELISA per Malattia Vescicolare Suina 64233 campioni di siero. Nell'arco di 6 mesi, il numero dei campioni esaminati è stato 7 volte superiore a quello dei campioni processati nei 10 mesi precedenti (gennaio-ottobre 2008; Grafico 1)

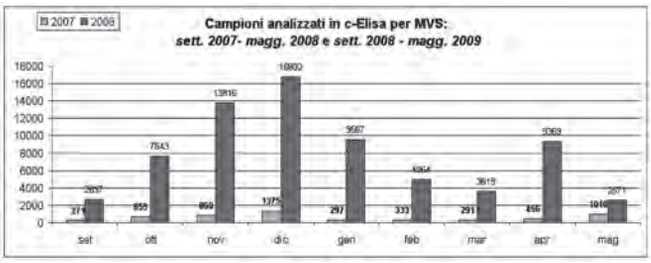


Grafico 1: N° campioni eseguiti, periodo sett. 2007-magg.2008 e sett. 2008-magg.2009.

Il picco epidemico, di 8 focolai, si è verificato nella 5ª settimana di epidemia e 5 di questi focolai erano nel comune di Bettona (Grafico 2).

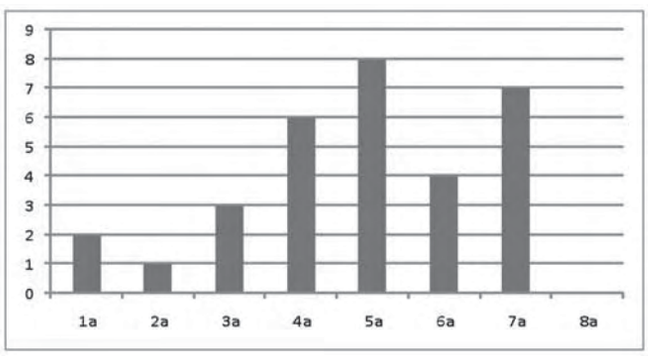


Grafico 2: curva epidemica nell'epidemia di malattia vescicolare del 2008 in Umbria

Il comune con il maggior numero di focolai (13/30) è risultato, invece, Gubbio. Le indagini epidemiologiche effettuate in questo comune hanno messo in evidenza che i 13 focolai erano tutti secondari, in quanto correlati epidemiologicamente (acquisto di animali) con i primi 2 focolai. Si trattava di allevamenti a carattere familiare che avevano acquistato gli animali per autoconsumo.
La tipologia di allevamento più colpita è stata l'indirizzo produttivo "ingrasso" (76% dei focolai). Dall'analisi statistica effettata per evidenziare i possibili fattori di rischio nell'epidemia, l'indirizzo produttivo associato alla malattia in modo statisticamente significativo è risultato essere la "stalla di sosta". Gli altri fattori di rischio associati alla presenza della malattia ($p \leq 0,05$) sono risultati: la consistenza di suini in allevamento >500 capi, la localizzazione dell'allevamento in un comune con densità di allevamenti suini in 10 Km^2 >5 e la localizzazione dell'allevamento in un comune con densità di capi suini in 10 Km^2 >1000.

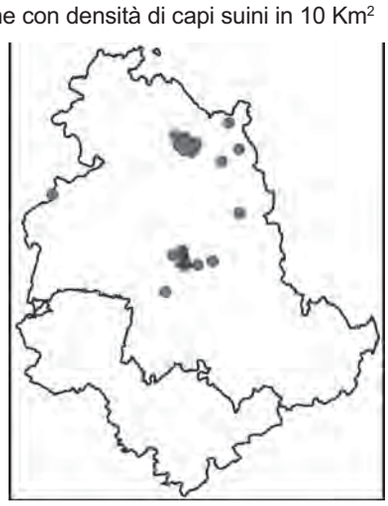


Fig. 1: distribuzione dei focolai primari (▲) e secondari (●) in Umbria.

Nel corso dell'epidemia il Centro di Referenza ha provveduto alla conferma di tutti i campioni di sangue risultati positivi/dubbi al test ELISA di screening. Le percentuali di conferma, effettuata in SN, sono state del 98,8% per i campioni positivi e dubbi emersi negli allevamenti focolaio dell'Umbria; del 100% quelle emerse nei focolai della regione Marche.
Oltre alla SN, che costituisce il test di conferma, i campioni sono stati anche sottoposti a isotipizzazione per IgG/IgM (5) evidenziando la seguente distribuzione nelle aziende sieropositive:
52,2% positività di classe IgG
19,9% positività di classe IgM
24,4% positività di classe IgG+IgM.
La conoscenza dell'isotipo degli anticorpi ha costituito un'informazione utile sia per scopi epidemiologici (aiuta a datare l'infezione) che per i veterinari responsabili dei prelievi nelle aziende poichè animali con anticorpi IgM sono eliminatori di virus attraverso le feci.
Nel corso della prima ondata epidemica, fino alla fine dell'anno, oltre alle 30 aziende-focolaio, sono stati evidenziati 36 allevamenti sieropositivi. Il 72,2% degli allevamenti era da ingrasso, il 19.4% a "ciclo chiuso", il restante 8,3% a "ciclo aperto". Le aziende sieropositive, non focolaio, hanno aggravato una situazione già molto complessa per i provvedimenti restrittivi adottati dovuti all'epidemia in corso. La possibilità di individuare nuovi focolai ed il significato da attribuire alle singole sieropositività possono essere condizionati anche dalla modalità di campionamento. Infatti, soprattutto in condizioni di emergenza, si può prestare scarsa attenzione ad una corretta distribuzione dei prelievi tra i capannoni ed all'interno dei singoli capannoni.
Il territorio umbro interessato dall'origine dell'epidemia di Malattia Vescicolare Suina è noto per essere caratterizzato da elevata densità di allevamenti suinicoli, molti dei quali di notevoli dimensioni: l'84% degli allevamenti di Bettona, il 60% di quelli di Bastia Umbra ed il 43% di quelli di Cannara, ha più di 500 capi. Numerosi sono gli scambi commerciali che queste aziende hanno con altre regioni italiane accreditate, con i Paesi dell'UE ma anche con regioni italiane non accreditate. La movimentazione di suini vivi, degli scarti, degli animali morti, i traffici commerciali legati all'indotto del settore sono intensi. Il rischio d'infezione e di una sua successiva diffusione è, pertanto, elevato e notevolmente amplificato dalla densità degli allevamenti, dalla loro consistenza e contiguità, dallo spostamento di mezzi, di persone e personale. A tutto ciò va aggiunta la problematica costituita dalle aziende da ingrasso inserite in realtà di tipo "pseudo-mulltisito" che effettuano frequenti movimentazioni di animali in tempi diversi, aumentando così l'entità del rischio.
Questo rende prioritaria l'applicazione delle basilari misure di biosicurezza che, tuttavia, è ancora disattesa.

BIBLIOGRAFIA

1. OM 12.4.2008: Misure sanitarie di eradicazione della Malattia Vescicolare del Suino e di Sorveglianza della Peste Suina Classica.
2. DPR 362: "Regolamento recante norme per l'attuazione della Direttiva 92/119/CE che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie degli animali nonché misure specifiche per la Malattia Vescicolare dei suini".
3. Decisione 799/2005/CE: relativa a talune misure sanitarie di protezione contro la Malattia Vescicolare dei suini in Italia.
4. OIE Manual Standard for Diagnostic Tests and Vaccines, 6ª Edizione 2008, Vol. 2, Parte Seconda, Sez. 2.8, Cap. 2.8.9
5. "Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotope against swine vesicular disease virus"- E. Brocchi, A. Berlinzani, D. Gamba, F. De Simone, Journal of Virological Methods, 52 (1995), 155-167.

PIANO DI MONITORAGGIO DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE DELLA REGIONE UMBRIA: DATI PRELIMINARI SULLA DIFFUSIONE DI *Listeria monocytogenes* E *Listeria* spp. NEI SALUMIFICI UMBRI

Crotti S.[1], Gattuso A.[2], Cucci S.[2], Gianfranceschi M.V.[2], Bazzucchi V.[1], Bonanno S.[1], Zicavo A.[1], Scuota S.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; [2] Istituto Superiore di Sanità

Key Words: *L. monocytogenes*, PFGE, PCR

ABSTRACT
In order to evaluate the diffusion and distribution of *Listeria monocytogene*s and *Salmonella* spp. in the salami manufacturing industries of Umbria region (Central Italy), a two years long "Monitoring Plan" (2008-2010) was created in 2008 by Umbria Region, AASSLL and Istituto Zooprofilattico Sperimentale. In this work we report the preliminary data about the diffusion of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp. in these industries. Innovative molecular methods are used to evaluate the management system, to monitor the trend over the years correlating the different isolated strains and possibly to asses a food safety strategy.

INTRODUZIONE
L'analisi del rischio è un metodo sistematico per valutare i rischi in modo più completo, per chiarire fenomeni complessi e per affrontare incertezze e lacune sulla loro origine; grazie ad essa è possibile individuare standard di salubrità degli alimenti. Per i prodotti tradizionali italiani, compresi quelli del territorio umbro, mancano dati circa la loro salubrità; in particolare c'è ancora carenza di informazioni su patogeni quali Salmonella e Listeria che, insieme a Campylobacter, sono ritenuti i principali responsabili di tossinfezione alimentare e causa di allerte alimentari nazionali ed internazionali.
A tale scopo, nell'ambito del "Piano Integrato dei controlli 2007-2010 sulla Sicurezza Alimentare – Regione Umbria", a partire dal 2008, è stato inserito un piano di monitoraggio per *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., con durata biennale che coinvolge la Regione, le Aziende Sanitarie Locali (AASSLL) e l' Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZSUM). Obiettivo del piano di monitoraggio è quello di valutare la diffusione di questi due patogeni negli ambienti di lavorazione e nelle attrezzature dei salumifici del territorio e nei prodotti di salumeria. Scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare geneticamente i ceppi di *L. monocytogenes* isolati, determinandone il pulsotipo, mediante "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) ed il sierotipo, tramite analisi in PCR.
Nel corso dell'indagine sono state isolate *Listerie* diverse da *L. monocytogenes*; pertanto si è deciso di indagare anche quest'ultime, valutandone la diffusione.
In questo lavoro vengono riportati i risultati del primo anno di indagine relativi alla diffusione di *L. monocytogenes* e di *Listeria* spp. I dati ottenuti, seppure preliminari, forniranno informazioni sulla circolazione di tali patogeni all'interno delle strutture e potranno essere usati per impostare una efficace strategia di controllo ai fini della sicurezza alimentare.

MATERIALI E METODI
Nel 2008 sono stati analizzati 416 campioni, di cui n. 296 tamponi ambientali e n. 120 campioni alimentari (prosciutti, salami e salsicce).
Ricerca ed identificazione dei ceppi di *Listeria*: per la ricerca di *L. monocytogenes* è stato utilizzato il metodo AFNOR BIO 12/11-03/04. Per la ricerca di *Listeria* spp. è stato utilizzato il metodo AFNOR BIO 12/02-06-94. In entrambi i casi i ceppi positivi allo screening sono stati confermati secondo quanto previsto dalla UNI EN ISO 11290-1:2005 e identificati mediante API Listeria (Biomerieux®).
PCR per *L. monocytogenes*: la PCR di specie è stata condotta secondo il protocollo di Barocci et al. (2). I primer impiegati (L5 5'-AACCTATCCAGGTGCTC-3' e LL6 5'-CTGTAAGCCATTTCGTC-3') sono specifici del gene *hlyA* che codifica per una esotossina batterica (listeriolisina O) coinvolta nel meccanismo patogenetico di *L. monocytogenes* (8).
Multiplex PCR per *Listeria* spp e restrizione enzimatica: tale metodica biomolecolare, che consente la simultanea identificazione di *L. innocua*, *L. seeligeri, L. welshimeri* e *L. ivanovii*, è stata condotta in accordo ai protocolli riportati in letteratura (3, modificato; 1).
Sierotipizzazione mediante multiplex PCR: è stata eseguita utilizzando i primer descritti nel lavoro pubblicato da Doumith et al. (4) che permettono di separare i 4 maggiori sierotipi di *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) in 4 gruppi distinti. La conferma dei sierotipi all'interno dei singoli sierogruppi è stata effettuata utilizzando la metodica della siero-agglutinazione.
Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): l'estrazione del DNA, la digestione dei campioni con l'enzima *AscI* e l'elettroforesi in campo pulsato sono state eseguite secondo il protocollo descritto da Graves and Swaminathan (6) per il programma PulseNet. Come riferimento per l'analisi dei profili di restrizione viene caricato su ogni gel il DNA genomico di Salmonella Braenderup H9812, digerito con enzima *XbaI.*
La corsa elettroforetica è stata eseguita utilizzando un sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Hercules, CA) ad un gradiente di 6 V/cm, angolo 120°, uno switch time di 4-40 secondi a 14°C per 21 ore.
Il gel è stato colorato con etidio bromuro e l'immagine acquisita con il sistema di acquisizione immagini Bio-Rad Gel Doc 2000™ (Bio-Rad, Hercules, USA). I profili molecolari sono stati analizzati con il software BioNumerics (ver. 4.0; Applied Maths, Saint-Martins-Latem, Belgio), che elabora il dendrogramma mediante l'Underweight-Pair Group Matching Algorithm (UPGMA) a partire da una matrice di similarità ottenuta utilizzando il coefficiente di correlazione Dice con limite di tolleranza e ottimizzazione dell'1,0%.

RISULTATI
Dei 416 campioni esaminati 19 sono risultati positivi per *L. monocytogenes* con una prevalenza del 4,5% e 7 campioni sono risultati positivi per *Listeria* spp. Tutti i campioni positivi al metodo microbiologico sono stati confermati in PCR.
Multiplex PCR per *Listeria* spp.: la tipizzazione molecolare di *Listeria* spp. ha permesso di evidenziare 5 ceppi di *L. welshimeri*, 4 isolati da alimenti ed 1 isolato da ambiente e 2 ceppi di *L. innocua*, entrambi provenienti da alimenti.
Sierotipizzazione: l'84,2% dei ceppi di *L. monocytogenes* è risultato appartenere al sierotipo 1/2c (16/19 campioni), mentre il restante 15,8% al sierotipo 1/2a (3/19 campioni).

PFGE: i ceppi tipizzati con PFGE hanno evidenziato profili di restrizione caratterizzati da un numero di bande compreso tra 10 e 13. Sono stati considerati uguali solo i ceppi con profilo di restrizione indistinguibile sia per il numero che per la posizione delle bande. Tra tutti i ceppi analizzati, un ceppo isolato da salame è risultato non tipizzabile.
I 18 ceppi di *L. monocytogenes* (14 alimentari e 4 ambientali) sono stati suddivisi in 9 pulsotipi e raggruppati in 2 pulsogruppi

con un livello di similarità ≥ 80%. I pulsogruppi sono stati contraddistinti con le lettere A e B.
Il pulsogruppo A comprende 15 isolati suddivisi in 6 pulsotipi con un livello minimo di similarità dell' 84,0%. Il pulsogruppo B è costituito da 3 ceppi suddivisi in 3 pulsotipi con un livello minimo di similarità dell' 80,9%.
Prendendo in considerazione i profili di restrizione di tutti i ceppi, si osserva una percentuale di omologia che varia da un minimo del 72,3% ad un massimo del 100%.
In Tabella 1 sono riportati i pulsotipi più numerosi distribuiti in riferimento al numero di ceppi di *L. monocytogenes* e alla fonte di isolamento. Il pulsotipo 5 è l'unico in cui sono rappresentate tutte e 3 le categorie prese in considerazione e comprende 7 ceppi, 3 isolati da salsiccia, 2 da salame e 2 ambientali, tutti di sierotipo 1/2c.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONII

Dall'analisi della correlazione sierotipo/alimento è emerso che il sierotipo 1/2c è prevalente tra i ceppi analizzati. Tale prevalenza può essere ricondotta al fatto che in Italia la carne suina, che rappresenta la materia prima per la produzione di insaccati, è frequentemente contaminata da ceppi di *L. monocytogenes* appartenenti a questo sierotipo (5). Solo tre ceppi, due isolati da ambiente e uno da salsiccia, appartengono al sierotipo 1/2a.
La caratterizzazione molecolare dei ceppi analizzati ha messo in evidenza una completa correlazione tra sierotipi e pulsotipi, poiché il 100% dei ceppi con identico pattern PFGE appartiene allo stesso sierotipo. Sette ceppi del pulsotipo 5 e tre ceppi del pulsotipo 7 (Tabella 1.) isolati in salumifici diversi, mostrano identico sierotipo/pulsotipo. Tale risultato mette in evidenza la persistenza nel tempo di alcuni ceppi di *L. monocytogenes* in ambito territoriale, riconducibili alla probabile contaminazione della carne suina e conseguentemente dell'ambiente di lavorazione e del prodotto finito.
La presenza, seppure in numero ridotto, di altre specie di *Listeria*, in particolare di *L. innocua* e *L. welshimeri*, anche associate a *L. monocytogenes*, è ampiamente descritta in letteratura. Queste due specie sono infatti le più frequentemente riscontrate negli alimenti; *L. innocua* viene infatti considerata da alcuni autori un indicatore della presenza di *L. monocytogenes* (3, 7).

BIBLIOGRAFIA

1. Barocci S., Malvestiti A., Valli M.B. 2006. Direct identification of *Listeria* spp. by molecular methods. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria: numero 34, gennaio-febbraio 2006 (http://www.pg.izs.it/webzine.html).
2. Barocci S., L. Calza, G. Blasi, S. Briscolini, M. De Curtis, B. Palombo, L. Cucco, M. Postacchini, M. Sabbatini, T. Graziosi, S. Nardi, G. Pezzotti. 2008. Evaluation of a rapid molecular method for detection if *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. Food Control, **19,** 750-756.
3. Bubert A., I. Hein, M. Rauch, A. Lehner, B. Yoon, W. Goebel, M. Wagner. 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology, 4688-4692.
4. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 3819-3822.
5. Gianfranceschi M. V., Gattuso A., Fiore A., D'Ottavio M. C., Casale M., Palumbo A. and Aureli P. 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* in uncooked Italian dry sausage (salami). Journal of Food Protection, **69**, 1533-1538.
6. Graves L.M. and Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology, **65,** 55-62.
7. Huang B., Eglezos S., Heron B.A., Smith H., Graham T., Bates J., Savill J. 2007. Comparison of multiplex PCR with conventional biochemical methods for the identification of Listeria spp. Isolates from food and clinical samples in Queensland, Australia. Journal of Food Protection, **70(8)**:1874-80.
8. Portnoy D.A., Chakraborty T., Goebel W, Cossart P. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infection and Immunity, **60**, 1263-1267.

Pulsotipo	N. isolati (Pulsogruppo)	Sierotipo	N. Ceppi per tipologia alimento:		
			Ambiente	Salsiccia	Salame
5	7 (A)	1/2c	2	3	2
7	3 (A)	1/2c		2	1
4	2 (A)	1/2c		1	1

Tabella 1. Pulsotipi più numerosi, in ordine decrescente di numerosità di ceppi

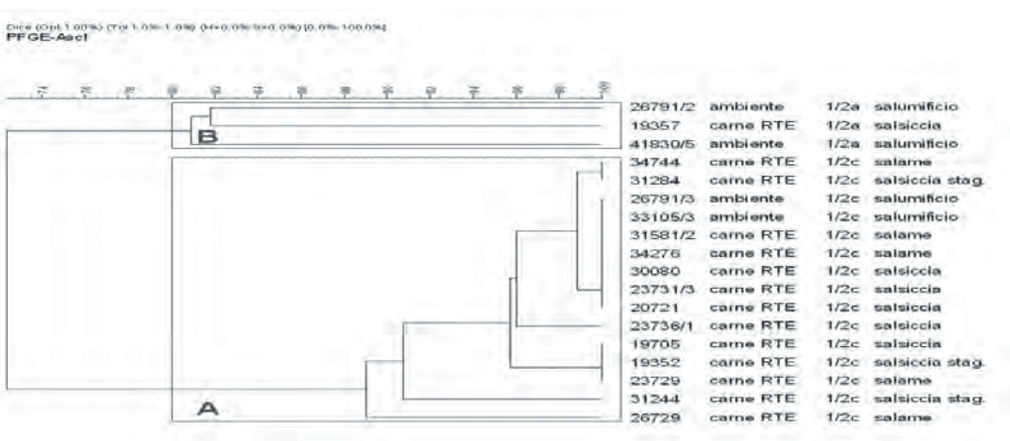

PFGE-AscI
B
A
28791/2 ambiente 1/2a salumificio
19357 carne RTE 1/2a salsiccia
41830/5 ambiente 1/2a salumificio
34744 carne RTE 1/2c salame
31284 carne RTE 1/2c salsiccia stag.
26791/3 ambiente 1/2c salumificio
33105/3 ambiente 1/2c salumificio
31581/2 carne RTE 1/2c salame
34276 carne RTE 1/2c salame
30080 carne RTE 1/2c salsiccia
23731/3 carne RTE 1/2c salsiccia
20721 carne RTE 1/2c salsiccia
23736/1 carne RTE 1/2c salsiccia
19705 carne RTE 1/2c salsiccia
19352 carne RTE 1/2c salsiccia stag.
23729 carne RTE 1/2c salame
31244 carne RTE 1/2c salsiccia stag.
26729 carne RTE 1/2c salame

Figura 1. Dendrogramma dei profili molecolari dei ceppi di L. monocytogenes. A e B rappresentano i due pulsogruppi individuati con livello di similarità ≥ 80%.

IDENTIFICAZIONE DI ALIMENTI PER USO ZOOTECNICO IRRADIATI A SCOPO CONSERVATIVO E VALUTAZIONE MICROBIOLOGICA DEL TRATTAMENTO RADIANTE

D'Oca M.C. [1], **Cammilleri M.C.** [1], **Giuffrida S.A.** [1], **Ferrante R.** [1], **Fuochi P.** [2], **Macaluso A.** [3], **Dara S.** [3], **Arculeo P.** [3], **Cardamone C.** [3]

(1) *Facoltà di Farmacia, Dipartimento Farmacochimico, Tossicologico e Biologico, Università degli studi di Palermo, Palermo*
(2) *Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività "CNR", Bologna*
(3) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo*

Key words: mangimi, alimenti irradiati, ESR

ABSTRACT

The Radiation Treatment is a safe e reliable method used for food and feed preservation. Among the Physical Identification Method, validated by European Committee of Standardization, the Spectroscopy ESR is suitable for vegetable food.

The aim of this work has been to value the possibility to extend the use of Spectroscopy ESR also to irradiated feed and value sanitization activity of feed of ionizing radiation.

INTRODUZIONE

Una delle principali contaminazione dei mangimi è la contaminazione da parte di microrganismi patogeni.

Tra i metodi innovativi di sanitizzazione degli alimenti per uso umano e zootecnico si annovera l'uso di radiazioni ionizzanti (1), in quanto capaci di danneggiare il materiale genetico dei microorganismi e quindi inibirne la crescita microbica.

Sebbene esistano norme comunitarie che regolamentano l'uso delle radiazioni ionizzanti a scopo conservativo e siano stati validati metodi per l'identificazione del trattamento radiante per gli alimenti per uso umano, alcuna regolamentazione è stata invece emanata né per l'uso né per l'identificazione di alimenti per uso zootecnico irradiati .

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di:

- valutare la possibilità di estendere l'uso della Spettroscopia di Risonanza Spin Elettronico (ESR), quale Metodo Fisico di Identificazione di Alimenti Irradiati, validato dal Comitato Europeo di Normazione (CEN), agli Alimenti per uso Zootecnico (2)
- valutare se anche a basse dosi di irraggiamento sia possibile ottenere un effetto sanitizzante, determinando se tale trattamento sia in grado di ridurre e di quanto la carica microbica infestante (3).

MATERIALI E METODI

Le tipologie di mangimi analizzate sono: soia, grano duro e mangime completo, utilizzati in avicoltura.

Un'aliquota di ciascun mangime è stata irradiata in un range di dose tra 1 e 5 kGy, (dosi tipicamente utilizzate per l'irraggiamento di matrici alimentari di natura vegetale al fine di ridurre la contaminazione microbica).Gli irraggiamenti sono stati effettuati con un irradiatore gamma panoramico IGS-3 con sorgente di ^{60}Co presso l'istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività "CNR" di Bologna. Inoltre, un campione per ciascuna tipologia di mangime non irradiato è stato utilizzato come bianco-campione.

La registrazione degli spettri ESR sono state effettuate utilizzando uno spettrometro Bruker ECS 106 messo a disposizione dal dipartimento di Fisica e Tecnologie Relative (DIFTER) dell'Università degli Studi di Palermo.

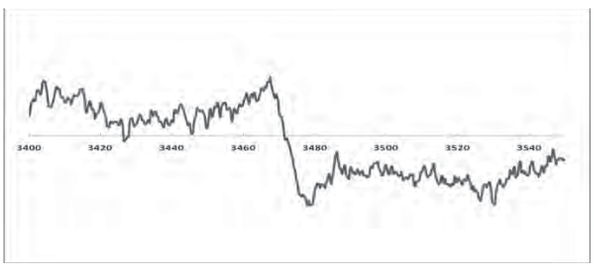
Le analisi microbiologiche sui mangimi sono state effettuate prima e dopo l'irraggiamento alla dose di 1 kGy, presso l'Area di Microbiologia degli Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Palermo, utilizzando i seguenti metodi:

Carica microbica totale a 30°C (ISO 4833:2003), Coliformi totali (ISO 4832: 2006), Stafilococchi coagulasi positivi (ISO 6888-1: 1999/Amendment 1:2003), Clostridi solfito-riduttori (ISO 15213:2003).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In figura 1 è mostrato lo spettro ESR di un campione di Soia non irradiato.

Fig.1: Spettro ESR di un campione di soia non irradiato

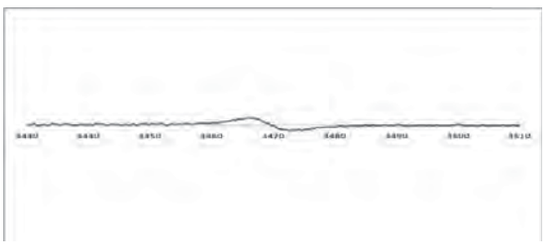


Dall'analisi dello spettro si osserva la presenza di un segnale caratterizzato da un solo picco, corrispondente ad un centro paramagnetico non radio-indotto; a seguito di irraggiamento alla dose di 5 kGy, come si osserva dallo spettro mostrato in fig.2, si ha la comparsa di due picchi laterali a distanza di 60 Gauss l'uno dall'altro (indicati dalle frecce) e un aumento dell'intensità del segnale singolo già presente nel campione non irradiato. A seguito di irraggiamento lo spettro del campione di soia è quindi caratterizzato da un tripletto. Così come descritto nel Protocollo Europeo EN 1787, questo spettro ESR è quello tipico degli alimenti irradiati contenti cellulosa; infatti in accordo con il protocollo EN 1787, l'identificazione di un alimento irradiato contenente cellulosa è da ritenersi positiva, quando lo spettro ESR è caratterizzato dalla presenza di due picchi satelliti rispetto a quello centrale già esistente a distanza di 60 Gauss.

Fig.2: Spettro ESR di un campione di soia irradiato a 5 kGy

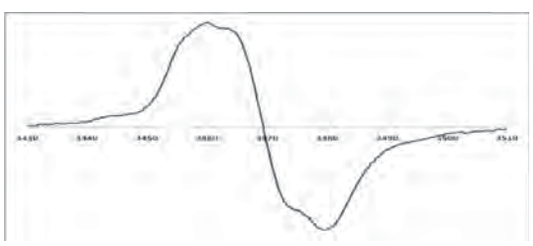
In fig. 3 è mostrato lo spettro ESR di un campione di grano non irradiato.
Anche in questo caso si ha un segnale singoletto, dovuto ad un centro paramagnetico non radio-indotto. Ma, come si può osservare dalla fig.4, che mostra lo spettro ESR di un campione di grano irradiato a 3 kGy, non si ha la comparsa dei picchi satelliti, tipici del

Fig. 3: Spettro ESR di un campione di grano non irradiato



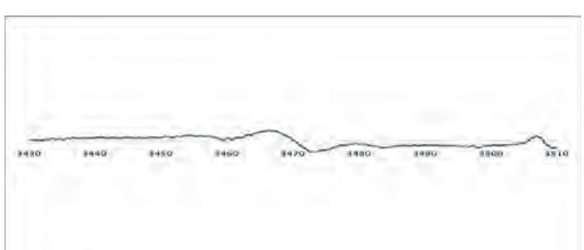
radicale della cellulosa, bensì uno spettro caratterizzato da un segnale con struttura complessa. Questo segnale è quello tipico degli alimenti irradiati contenenti matrici zuccherine, come descritto nel protocollo Europeo EN 13708;

Fig.4: Spettro ESR di un campione di grano irradiato a 3 kGy



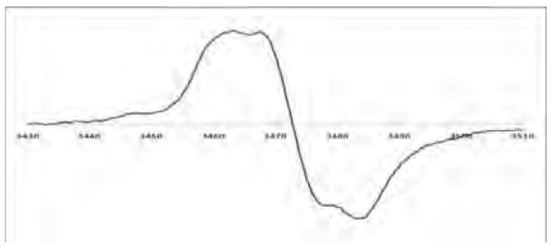
L'assenza del segnale radio-indotto della cellulosa ed invece la comparsa di quello della matrice zuccherina, può essere spiegato considerando che l'analisi ESR prima e dopo irraggiamento è stata condotta sull'intero chicco di grano e non solo sulla crusca o tegumento esterno, contenente in maniera predominante cellulosa; infatti la componente principale del grano è quella amidacea e quindi zuccherina, che risulta essere il marker predominante delle radiazioni ionizzanti.
In fig 5 è mostrato lo spettro ESR di un campione di mangime completo non irradiato, anch'esso caratterizzato da un segnale singolo imputabile ad un centro paramagnetico non radio-indotto.

Fig.5: Spettro ESR di un campione di mangime completo non irradiato



In fig 6 è mostrato lo spettro ESR di un campione irradiati a 5 kGy.

Fig. 6: Spettro ESR di un campione di mangime completo irradiato a 5 kGy



Anche i questo caso lo spettro del campione irradiato è caratterizzati da un segnale a struttura complessa imputabile alla matrice zuccherina.
In tabella 1 e 2 sono riportati i risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche prima e dopo irraggiamento alla dose di 1 kGy.

tabella 1:
analisi microbiologiche prima e dopo irraggiamento di mangime completo alla dose di 1 kGy.

Analisi Microbiologica	Mangime completo non irradiato (u.f.c./g)	Mangime completo irradiato (u.f.c./g
Carica microbica a 30°C	6.4 x 10^3	8.0 x 10^1
Coliformi totali	4.0 x 10^2	< 1 x 10^1
E. coli	< 1 x 10^1	< 1 x 10^1
Stafilococchi coag. positivi	3.6 x 10^2	< 1 x 10^1
Clostridi solfito-riduttori	5.0 x 10^2	< 1 x 10^1

tabella 2:
analisi microbiologiche di soia prima e dopo irraggiamento alla dose di 1 kGy

Analisi Microbiologica	Soia non irradiata (u.f.c./g)	Soia irradiata (u.f.c./g)
Carica microbica a 30°C	1.6 x 10^3	2.2 x 10^2
Coliformi totali	< 1 x 10^1	< 1 x 10^1
E. coli	< 1 x 10^1	< 1 x 10^1
Stafilococchi coa.g positivi	8.0 x 10^1	< 1 x 10^1
Clostridi solfito-riduttori	3.0 x 10^1	< 1 x 10^1

I risultati sperimentali ottenuti hanno permesso di valutare come la spettroscopia ESR possa essere utilizzata come tecnica di identificazione dell'avvenuto trattamento radiante anche di alimenti per uso zootecnico.
Inoltre, questo studio ha permesso di confermare che l'uso di radiazioni ionizzanti sia un valido metodo di sanitizzazione di alimenti ad uso Zootecnico anche alla dose più bassa di 1 kGy, cosa che garantisce un'alta qualità alimentare dei mangimi ed una maggiore sicurezza alimentare sia per gli allevatori che per i consumatori.

1. World Health Organization (1994) - Safety and nutritional adequacy of irradiated food-. WHO, Geneva.

2. C. Boniglia, S. Onori, O. Sapora – Il trattamento dei prodotti alimentari con radiazioni ionizzanti- Not. Ist. Superiore di Sanità 2003

3. World Health Organization (1999)- High-Dose Irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10kGy.- Technical Report Series No. 890, WHO, Geneva.

PERCEZIONE DEL RISCHIO TOXOPLASMOSI IN GRAVIDANZA: PROGETTO PILOTA NELLA REGIONE PIEMONTE

[1]Decastelli L., [1] Pivetta E., [2]Griglio B., [2]Sattanino G., [2]Marotta V., [2]Pezzoli L., [2]Massari L., [2]Musella C., [3]Ghiotti M.P.
1 S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni - Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;
2 Dipartimento di Prevenzione – Igiene degli alimenti di origine animale – ASL TO5 di Chieri (TO)
3 Coordinamento Dipartimenti Materno Infantile – Direzione Programmazione Sanitaria Assessorato Sanità Regione Piemonte

Key words: toxoplasmosis, pregnancy, risk communication

SUMMARY
A survey on the perception by pregnant women of food safety risks was performed using the focus group technique in the contest of a multidisciplinary project on food safety coordinated by a Local Health District (ASL8 - Chieri) of Piedmont. It emerged that pregnant women are aware of the risks about Toxoplasmosis, but they rely on information that is sometimes different and conflicting.

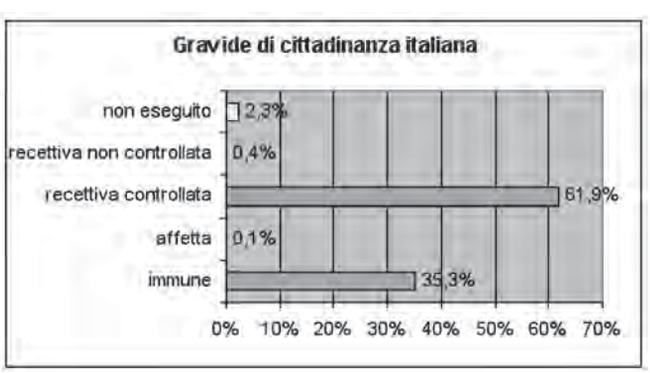
INTRODUZIONE
L'analisi del rischio è un metodo valido per identificare i potenziali effetti sulla salute pubblica da parte di microrganismi patogeni che contaminano gli alimenti (*risk assessment*) e per favorire la gestione dei problemi (*risk management*).
Presso l'ASL TO5 di Chieri (Piemonte), nell'ambito di un progetto pilota multidisciplinare sulla sicurezza alimentare, sono state effettuate indagini sulla percezione del rischio legato agli alimenti in donne in gravidanza, mediante la tecnica dei *focus group*. Dagli incontri è emerso che le gestanti hanno una forte consapevolezza del rischio toxoplasmosi, ma possiedono informazioni varie e talvolta contrastanti rispetto ai comportamenti da evitare. Parallelamente un sondaggio effettuato presso il dipartimento materno infantile del territorio piemontese ha evidenziato l'assenza di protocolli di informazione standardizzati per tale rischio in gravidanza. Emerge di conseguenza la difficoltà da parte di ginecologi ed ostetriche nel fornire indicazioni omogenee basate su evidenze scientifiche.

MATERIALI E METODI
Al fine di ottenere dati oggettivi per la realizzazione di un protocollo informativo sono stati messi a confronto i dati bibliografici relativi alla pericolosità dei diversi alimenti ed i risultati dei programmi di controllo internazionali, nazionali e regionali. Sono stati considerati i diversi rischi alimentari in gravidanza: toxoplasmosi, listeriosi, metilmercurio, PCB e diossine.
Dopo la raccolta e l'analisi della bibliografia, per consentire uno scambio di informazioni tra gli *stakeholder,* si è ritenuto opportuno realizzare un sondaggio tra esperti selezionati (ginecologi, medici di base, nutrizionisti, esperti in sicurezza alimentare) mediante il Metodo Delphi, che consente, tramite la somministrazione ripetuta di questionari in cui vengono forniti elementi bibliografici, di creare un dibattito "virtuale", intorno all'oggetto della ricerca. Nel questionario si chiedeva di attribuire un livello di rischio ad alcune tipologie di alimenti. Le 4 valutazioni proposte, sempre in relazione al periodo della gravidanza, erano:

- Nessun rischio: alimenti ritenuti assolutamente sicuri;
- Basso rischio: alimenti vanno consumati con alcune precauzioni (es. cottura, lavaggio approfondito);
- Medio rischio: alimenti per i quali è consigliata l'esclusione;
- Alto rischio: alimenti assolutamente da evitare.

RISULTATI
L'analisi della bibliografia ha rilevato come *Toxoplasma* sia presente in vari alimenti, ma come i casi clinici ad essi imputabili non siano necessariamente correlati. Sono pertanto da considerare fortemente a rischio carni ovine (6), carni suine (8,9), carni di selvaggina, vegetali in genere (1), ma anche latte caprino crudo, carni bovine crude o poco cotte e acque contaminate con feci di felini. Si segnala un caso isolato di contaminazione dell'acquedotto municipale in Canada, con 7718 persone coinvolte (4). Sono invece da considerare alimenti sicuri tutti gli alimenti ben cotti, latte bovino, carni di pollo e coniglio, carni di cavallo, uova e ovoprodotti (3).
Per quanto riguarda i metodi di conservazione degli alimenti atti ad inattivare questo parassita, si rileva una scarsa univocità di indicazioni, a causa dell'esiguo numero di studi effettuati sulle tecnologie applicate nel nostro paese (2). Si possono comunque considerare efficaci: cottura ad almeno 67° C per almeno 3,6 minuti, congelamento casalingo (-12°/-15° C) e commerciale (-20°C) per almeno 24 ore, salagione (sale >6%) (5); l' affumicamento non è invece un metodo di conservazione efficace (10).
I dati epidemiologici forniti dal dipartimento materno infantile rilevano che sul territorio piemontese il numero di donne sieronegative è considerevole (62% delle gestanti), mentre le sieroconversioni rilevate nel corso della gravidanza risultano estremamente ridotte (0,1%). Si consideri inoltre che si tratta di una patologia soggetta a notifica, ma fortemente sottostimata, a causa della aspecificità dei sintomi nei soggetti immunocompetenti, secondo quanto riportato nel bollettino SIMI 2007 della Regione Piemonte.

Grafici 1 e 2. Sieroconversioni in Piemonte durante la gravidanza in donne italiane e straniere



In seguito all'analisi dei questionari ottenuti mediante la tecnica Delphi, per quanto riguarda Toxoplasma, si è evidenziata una percezione in generale analoga tra gli esperti di sicurezza alimentare e coloro che si occupano di medicina clinica (ginecologi, pediatri e medici di base). Risulta invece esagerata la percezione delle donne gravide relativa al rischio di determinati alimenti che induce spesso comportamenti alimentari non necessari o scorretti.

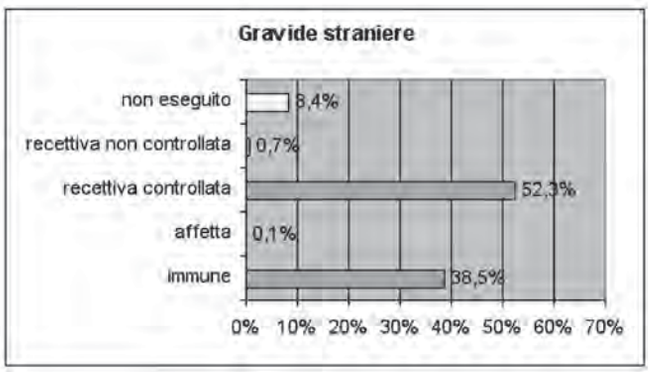


Tabella 1. Percezione dei rischio Toxoplasmosi legato ad alcuni alimenti. N=Nessuno; B=Basso; M=Rischio; A=Alto.

Alimenti	Stakeholder	Rischio			
		N	B	M	A
Salumi (prosciutti crudi, pancette..) prodotti a livello familiare	Gestanti				X
	Esperti sicurezza alimentare				X
	Clinici				X
	Gruppo di lavoro				X
Salumi (prosciutti crudi, pancette..) DOC, IGP	Gestanti				X
	Esperti sicurezza alimentare		X		
	Clinici		X		
	Gruppo di lavoro	X			
Carni affumicate	Gestanti				X
	Esperti sicurezza alimentare			X	
	Clinici			X	
	Gruppo di lavoro			X	
Verdure pre-lavate confezionate	Gestanti		X		
	Esperti sicurezza alimentare		X		
	Clinici	X			
	Gruppo di lavoro		X		

La Regione Piemonte ha richiesto per il 2008 un piano di monitoraggio su 100 campioni (carni fresche e preparazioni abitualmente consumate crude) per la ricerca di Toxoplasma. Le metodiche utilizzate nel corso di tale sperimentazione sono state due: sequenziamento genomico con tecnica automatica a marcati fluorescenti e PCR per rilevazione geni specifici per Toxoplasma gondii in alimenti. I campioni sono stati prelevati nelle diverse ASL in relazione alla produzione locale, con una positività media del 24,3%. Tale dato, correlato con una elevata sieronegatività (62%) nelle gestanti ma con una sieroconversione minima (0,1%) dovrà essere considerato nel corso delle future rilevazioni.

CONCLUSIONI

L'elevata percezione del rischio da parte delle gestanti induce comportamenti errati o non necessari riguardo la sicurezza alimentare. I risultati dimostrano la necessità di predisporre e mettere in atto adeguate campagne informative e di educazione alimentare che vedano una unicità di messaggi da parte delle strutture sanitarie, al fine di consentire la diffusione di notizie controllate in grado di ridurre allarmismi ed ansie ingiustificate percepite dalle donne, nell' ambito di una valutazione di costi e benefici di una campagna di informazione volta a ridurre i timori relativi al consumo di alimenti in gravidanza. È molto importante considerare la comunicazione del rischio non solo come scambio di informazioni tra le istituzioni e il cittadino, ma anche come parte delle gestione del rischio tra tutti i settori del sistema sanitario nazionale

Nella costruzione dei messaggi per il consumatore, tuttavia, permangono ancora difficoltà legate alla carenza di dati scientifici aggiornati sulla diffusione di *Toxoplasma gondii* negli alimenti in commercio nel nostro Paese. Ad esempio risulterebbe errato traslare alla nostra produzione di prosciutto crudo stagionato, le positività riscontrate in Inghilterra nel Raw Ham che ha pochi giorni di stagionatura.

BIBLIOGRAFIA

1. Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PF (2002) Prevalence of Toxoplasma gondii in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction-food for thought? Int J Parasitol 32:1193-9
2. Ballarini G, Martelli P. (2000) The false myth of toxoplasmosis in salami. Acta Biomed Ateneo Parmense.;71 Suppl 1:529-35.
3. Biancifiori F, Rondini C, Grelloni V, Frescura T. (1986) Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. Comp Immunol Microbiol Infect Dis.;9(4):337-46
4. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, Marion SA. (1997) Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. Lancet. Jul 19;350(9072):173-7.
5. Dubey JP. (1997) Survival of Toxoplasma gondii tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C. J Parasitol. Oct;83(5):946-9.
6. Jittapalapong S, Sangvaranond A, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Khachaeram W, Koizumi S, Maruyama S. (2005) Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. Vet Parasitol. Jan 4;127(1):17-22.
7. Mioni R. - Grimaldi M. - Trevisan R. - Cibotti S. - Cenci T. - Scuota S. - Losio M.N. - Pavoni E. - Decastelli L. - Pivetta E. - Giaccone V. - Lafisca A. (2005) "Valutazione igienico-sanitaria dei prodotti vegetali della IV gamma prodotti e commercializzati nel territorio nazionale: dati preliminari". Atti Conferenza Nazionale Oxoid 2005 "La sicurezza Microbiologica nella produzione di alimenti per il 21° secolo – Microbiologia degli alimenti conservati in stato di refrigerazione", 129 132
8. Pinard JA, Leslie NS, Irvine PJ. (2003) Maternal serologic screening for toxoplasmosis. J Midwifery Womens Health. Sep-Oct;48(5):308-16; quiz 386. Review.
9. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. (2000) Toxoplasma gondii: from animals to humans. Int J Parasitol. Nov;30(12-13):1217-58. Review. Erratum in: Int J Parasitol 2001 Feb;31(2):217-20
10. Warnekulasuriya MR, Johnson JD, Holliman RE. (1998) Detection of Toxoplasma gondii in cured meats. Int J Food Microbiol; 45: 211-21

Finanziamento: Ricerca corrente 2004 "La percezione del rischio nel campo della sicurezza alimentare: ricerca di strumenti per la valutazione e l'analisi"; Programma azione Regionale di Promozione Salute 2004-2007

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI ISONIAZIDE IN LATTE BOVINO MEDIANTE HPLC-DAD

Dosio D., Gili M., Migarone E., Olivo F.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Key words: latte, isoniazide, validazione

ABSTRACT

Bovine tuberculosis could become a serious public health threat for people especially in countries in which M. bovis infection is present in animals and conditions are favorable to zoonotic transmission.
Although the majority of developed countries use official test testing to bovine tuberculosis control according to classical and well defined program, this is not so easy to obtain.
The illegal use of isoniazid (IHN) by farmers to invalid the test of the bovine tuberculosis is a serious problem for the eradication of tubercular foci of infection. This practice becomes widespread in some regions and the risk for the consumer for the presence of residue of drug in product of animal origin increses.
A rapid and very effective HPLC-DAD procedure for the detection of isonicotinic acid hydrazide in cattle milk was developed and tested. The method validation study was performed according to criteria defined by Decision 2002/657/EC for quantitative confirmatory methods, and the following parameters were determined: linearity, specificity, CCa, CCβ, precision, recovery, ruggedness and stability. The proposed method is suitable for screening analysis.

INTRODUZIONE

L'isoniazide (idrazide dell'acido isonicotinico) è un chemioterapico antitubercolare; agisce inibendo la sintesi degli acidi micolici, componenti essenziali della parete cellulare del *Mycobacterium Tuberculosis*. L'utilizzo in zootecnia è vietato dal 1968 (D.M. 01.06.68 e successivo D. Lvo 119/92), sia perché non permette di evidenziare allevamenti bovini infetti da tubercolosi in quanto negativizza la prova tubercolinica, sia perché il consumo di latte proveniente da animali trattati comporta l'assunzione di quantità di farmaco che possono far insorgere fenomeni di farmaco-resistenza per i micobatteri.
La ricerca dell'isoniazide in latte bovino rientra quindi tra i controlli ufficiali effettuati dagli Istituti Zooprofilattici.
La maggior parte dei metodi descritti in letteratura prevede la derivatizzazione dell'analita a idrazone in ambiente acido e la successiva determinazione mediante HPLC-DAD.
Nel presente lavoro si descrive lo sviluppo di un metodo di conferma per la ricerca di isoniazide nel latte e la sua validazione in accordo ai requisiti comunitari richiesti dalla Decisione 2002/657/CE [(1)].
Secondo tale normativa comunitaria, per una prova di conferma di tipo quantitativo devono essere obbligatoriamente valutati i seguenti indici di prestazione: specificità, linearità della risposta strumentale, limite di decisione (CCα), capacità di rivelazione (CCβ), precisione, recupero, robustezza e stabilità.

MATERIALI E METODI

PREPARAZIONE CAMPIONI – Il latte in esame è preventivamente scremato mediante centrifugazione a 4°C a 4000 rpm. per 10'. A 1.8 mL di latte scremato sono aggiunti 180 µL di soluzione acquosa al 15% di acido tricloroacetico (TCA). Dopo agitazione in agitatore a vibrazione, si effettua una incubazione in termostato a 50°C per 30' allo scopo di favorire la precipitazione della frazione proteica.
Dopo centrifugazione a 4°C a 10000 rpm per 10 min., 1 mL di surnatante è derivatizzato in vial HPLC tramite aggiunta di 20 µL di aldeide cinnamica allo 0.5% in metanolo. La derivatizzazione è effettuata in termostato a 30°C per 30'. L'estratto derivatizzato, eventualmente filtrato su filtro a membrana da 0.2 µm, è utilizzato per l'analisi HPLC.

CONDIZIONI ANALITICHE – Per lo studio è stato utilizzato un cromatografo HPLC Agilent serie 1200, con rivelatore DAD a 330 nm (ref. a 550 nm). La seprarazione è condotta su colonna Phenomenex LUNA C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm), munita di precolonna Phenomenex C18 (4 x 3 mm, 3.5 µm), termostatata a 40°C, secondo un programma di eluizione a gradiente con fase mobile tampone ammonio acetato 1% acquoso pH 5.7 (A) e acetonitrile (B), flusso di 1 mL/min e volume di iniezione di 100 µL.

STUDIO DI VALIDAZIONE – Il processo di validazione del metodo è stato condotto seguendo lo schema proposto nella "Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di conferma per la determinazione di sostanze non autorizzate in accordo con la Decisione 2002/657/EC"[(2)] della Rete II.ZZ.SS., valutando i seguenti indici di prestazione:

- Linearità della risposta – Valutata mediante la costruzione di una curva di taratura dai dati ottenuti iniettando cinque soluzioni standard in solvente, a livelli di concentrazione di 6.7, 12.5, 25, 50 e 100 ng/mL replicate tre volte. L'algoritmo utilizzato è stato quello dei minimi quadrati non pesati; della retta ottenuta si è verificato il coefficiente di determinazione, la distribuzione dei fattori di risposta y_i/x_i, la significatività dell'intercetta e il limite di rivelabilità.
- Specificità – Valutata su 20 campioni di latte, verificando nei singoli cromatogrammi che, nell'intervallo $\Delta t = t_R$ standard ± 2,5%, non siano presenti interferenti della matrice.
- Precisione – Dopo aver individuato il valore di concentrazione minima C_0 a cui l'analita può essere identificato e quantificato in accordo ai requisiti della Dec. 2002/657/EC, è stata valutata la precisione del metodo su un latte fortificato con isoniazide a 3 livelli equidistanti di concentrazione (20 – 40 - 60 µg/L), corrispondenti a C_0, $2C_0$ e $3C_0$. Le prove sono state condotte in tre distinte sedute, effettuando 6 repliche per ogni livello. In ogni seduta è stata introdotta una curva in solvente per la valutazione del recupero. Sono state ottenute curve in matrice "ante" per ogni seduta; attraverso l'analisi della regressione con il metodo dei minimi quadrati non pesati è stata ottenuta la retta che meglio interpola i dati sperimentali. Sui risultati, raggruppati per livello, è stato determinato il recupero apparente e relativo CV% ed è stato effettuato un test di analisi della varianza ad un fattore (ANOVA), da cui sono stati determinati i valori di sr (ripetibilità) e Sr (riproducibilità intralaboratorio) per i singoli livelli.
- Recupero – La valutazione del recupero medio per ogni livello è stata fatta mediante standardizzazione esterna con curva in solvente, secondo la relazione:

$$R\% = C_{osservato}\,(\mu g/L) / C_{aggiunto}\,(\mu g/L) * 100.$$

- Limite di Decisione (CCα) e Capacità di rilevazione (CCβ) – Dai valori di Sr ottenuti sono stati calcolati il Limite di

Decisione CCα e la Capacità di rilevazione CCβ, secondo le seguenti relazioni:

$$CC\alpha = C_0 + 2.33\ Sr_{C0}$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64\ ((\ CV\%\ pooled^{*}\ CC\alpha)/100)$$

- Robustezza – Valutata mediante 8 prove su un campione fortificato a 25 µg/L, attraverso l'introduzione di piccole variazioni (non superiori al 10% del valore nominale) nelle fasi di preparazione del campione e di esecuzione dell'analisi, secondo il modello di Youden[3]. Le 7 variabili scelte sono state:
  1. concentrazione TCA
  2. volume di TCA
  3. temperatura deproteinizzazione
  4. tempo deproteinizzazione
  5. concentrazione aldeide cinnamica
  6. volume aldeide cinnamica
  7. temperatura derivatizzazione

- Stabilità degli estratti e delle soluzioni di lavoro – E' stata valutata la stabilità degli estratti e dei derivatizzati conservati un giorno a temperatura ambiente e delle soluzioni di lavoro conservate a -20°C.
- Incertezza di misurazione – La stima dell'incertezza di misura estesa relativa percentuale del risultato è stata effettuata in accordo alla "Linea guida per la valutazione e l'espressione dell'incertezza di misura dei metodi chimici" della Rete II.ZZ.SS.[4], con metodo bottom up integrato.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La procedura analitica utilizzata fa riferimento a un metodo descritto in letteratura[5], cui sono state apportate alcune modifiche ritenute migliorative sia nella fase di preparazione del campione che nella analisi strumentale.

Il metodo di analisi descritto consente, attraverso una procedura relativamente semplice, di ottenere un efficace grado di purificazione del campione: la maggior criticità in questa fase è rappresentata dalla frazione proteica della matrice. Le principali modifiche rispetto al metodo di partenza sono rappresentate dall'introduzione di una fase di deproteinizzazione a 50°C per 30 minuti e successiva centrifugazione a 10.000 rpm, che consentono di ottenere un estratto finale limpido anche dopo 12 ore dalla preparazione; ciò è fondamentale, considerato l'elevato volume di iniezione necessario per raggiungere i livelli di prestazione richiesti.

Durante la fase di sviluppo metodo è stata ottimizzata anche la temperatura di derivatizzazione: la derivatizzazione a temperatura controllata aumenta la ripetibilità dell'analisi.

Il rivelatore DAD utilizzato consente l'identificazione univoca dell'analita attraverso il matching spettrale con soluzione di standard in solvente.

Gli indici di prestazione ottenuti in fase di validazione e i relativi valori sono riportati nella tabella 1.

I cromatogrammi delle prove di specificità rilevano assenza di picchi significativi nell'intervallo ΔRt = Rt ± 2,5% dei tempi di ritenzione dello standard nella stessa seduta.

La risposta strumentale risulta lineare nel range di concentrazione 6.7 - 100 ng/ml, con R^2 = 0.9999, fattori di risposta ai vari livelli compresi nell'intervallo y/x_{medio} ± 10%, intercetta non significativamente diversa da 0, limite di rilevabilità < 6.7 ng/ml.

Sia il recupero apparente che la precisione sono risultati conformi ai requisiti richiesti.

E' stata verificata la capacità del metodo di identificare l'analita già al più basso dei livelli di concentrazione considerati (20 µg/L): i valori di matching spettrale sono risultati > 900 per tutti i livelli.

Lo studio di robustezza non ha evidenziato la presenza di variabili critiche tra quelle considerate ad eccezione del volume di TCA .

Gli estratti derivatizzati sono risultati stabili per almeno un giorno sia conservati a 4°C che a temperatura ambiente.

Le soluzioni intermedie e di drogaggio sono stabili per un periodo non inferiore a 6 mesi a -20°C.

CONCLUSIONI

Il metodo messo a punto presenta caratteristiche di specificità, precisione e robustezza adeguate allo scopo, per cui risulta idoneo alle analisi di conferma effettuate nell'ambito dei controlli ufficiali.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 (2002/657/CE), G.U.C.E. L.221, 2002.
2. Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di conferma per le sostanze non autorizzate in accordo con la decisione 2002/657/EC - rev. 3.
3. W.J.Youden, E.H.Steiner, Statistical Manual of AOAC, Association of Official Analytical Chemist, 33, 1975.
4. Linea guida per la valutazione e l'espressione dell'incertezza di misura dei metodi chimici - rev. 1
5. Palonta P.; Boni P;.Varisco G; Dusi G.; Belluzzi G.:: Determination of isoniazid in bovine milk by HPLC. Euroresidue VI, Egmond aan Zee (NL)

Tabella 1: Risultati di validazione

Linearità	Verificata nel range 6.7 –100 ng/mL R^2 = 0.9999 y_i/x_i, nell'intervallo y/x_{medio} ± 10%
Specificità	verificata su 20 campioni di latte bovino
CCα	22.5 µg/L
CC β	24.4 µg/L
CV% ripetibilità	I° livello: 3.76; II° livello: 2.47; III° livello: 4.38
CV% riproducibilità intralaboratorio	I° livello: 5.39; II° livello: 4.58; III° livello: 4.56
Limite ripetibilità (µg/L)	I° livello: 4.24; II° livello: 4.91; III° livello: 4.78
Robustezza	variabile critica: volume TCA
Stabilità soluzioni	Almeno 6 mesi a – 20°C
Stabilità estratto	Non inferiore a 1 giorno a T° ambiente
Incertezza di misura	17 % (K=2 LF=95%)

ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI STAFILOCOCCHI ISOLATI DA CANI AFFETTI DA PIODERMITE: CARATTERISTICHE FENOTIPICHE E GENOTIPICHE DI STIPITI *MEC*A+

Emanuele M.C., Piraino C., Bosco R., Chiarenza J., La Giglia M., Vitale M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

Keywords: antimicrobial resistance, mecA

ABSTRACT
Antimicrobial resistance of clinical Staphylococcus species (N. 13 *S. intermedius* and N. 2 *S. aureus*) isolated from canine pyoderma was investigated.
Methicillin resistance was also investigated by phenotypic and genotypic methods according to NCCLS recommendations. All the strains were susceptible to Cefotaxime, Enrofloxacin, Vancomycin and showed resistance to three or more of the antimicrobials tested; 7 out of 15 strains were resistant to tetraciclyne, 5 of them exhibited also erythomicin and clindamycin resistance.
The *mec*A gene was found in four of multiresistant strains, showing heterogeneous phenotypic characteristics with low levels of MIC.The high finding of antibiotic resistance is likely to be due to the selective pressure exerted by previous and repeated antimicrobial treatment since the dogs were affected from recurrent pyoderma.

INTRODUZIONE
Le piodermiti canine sostenute prevalentemente da *S. intermedius* costituiscono un problema terapeutico, in quanto le forme recidivanti/croniche sono frequenti e la terapia farmacologica risulta spesso inefficace.
I trattamenti antibiotici protratti nel tempo e ripetuti, sia per via sistemica che topica, con molecole ad ampio spettro (amoxicillina/clavulanato) e a spettro ristretto (eritromicina), che spesso non tengono conto dello spettro di sensibilità del germe, rappresentano un fattore di rischio per l'instaurarsi di resistenze batteriche multiple, a causa della pressione selettiva esercitata. E'ampiamente documentata l'elevata frequenza di riscontro di resistenze nell'ambito di stafilococchi coagulasi positivi isolati da cani, per quanto riguarda le molecole di più largo impiego nella pratica veterinaria (resistenti a: beta-lattamici >60%, tetracicline>30% e anche macrolidi >20%), con un trend di resistenza in crescita (2,9)
Trattandosi inoltre di animali che vivono in ambiente domestico, spesso a contatto con bambini, non è da sottovalutare il rischio connesso con il trasferimento di stipiti multiresistenti all'uomo.
Pertanto, è stata effettuata un'indagine su un gruppo ristretto di stipiti batterici provenienti da casi di piodermite, sicuramente sottoposti ad una pressione selettiva, per evidenziare i profili di resistenza relativi ad alcune molecole antibiotiche comunemente usate e la presenza di stafilococchi resistenti alla meticillina (MRSA/MRSI).

MATERIALI E METODI
Sono stati esaminati 15 stipiti: 13 di *Staphylococcus intermedius* e 2 di *Staphylococcus aureus*, collezionati dal laboratorio di Batteriologia Specialistica nell'arco di dieci anni, isolati da tampone cutaneo e croste canine.
Per le prove di sensibilità agli antibiotici "*in vitro*" è stata utilizzata la metodica della diffusione in agar (DDT;Kirby-Bauer), con i seguenti antibiotici (Oxoid): amoxicillina/ac clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), cefotaxime (CTX), clindamicina (DA), enrofloxacina (ENR), eritromicina (E), ossitetraciclina (OT), tetraciclina (TE), vancomicina (VA), alle concentrazioni indicate dall'NCCLS (10). La minima concentrazione inibente (MIC) è stata determinata tramite la metodica della microdiluizione mediante l'utilizzo del sistema Sensititre (Trek™), che comprende oltre 20 antibiotici.
Le indagini sulla presenza di ceppi resistenti alla meticillina (MRSA ed MRSI) sono state effettuate sia con metodi convenzionali (10) che biomolecolari (3).
Tecniche convenzionali
Per la preparazione dell'inoculo si è utilizzata la tecnica della sospensione diretta incubando le piastre ad una temperatura di 35°C per 24 ore, con dischetti di oxacillina 1µg (Oxoid).
Per la determinazione delle MIC è stato impiegato brodo Mueller-Hinton addizionato di cationi ed NaCl (CAMHB+2%NaCl). Le piastre (microtiter 96 pozzetti) sono state inoculate con diluizioni seriali (0,125-64 µg/ml) a partire da una soluzione stock con 1280 µg/ml di oxacillina (Sigma).
Per ogni ceppo sono stati inseriti un controllo di crescita (senza antibiotico) ed un controllo di sterilità (solo terreno).
Tecniche biomolecolari
L'estrazione del DNA è stata effettuata tramite il kit *Sigma gene elute mammalian secondo le* istruzioni indicate. Per l'amplificatione del gene *mec*A sono stati utilizzati I seguenti primers: MPXmec 5' TCC AGG AAT GCA GAA AGA CCA AAC GA 3'; MPXrevmec 5' GAC ACG ATA GCC ATC TTC TTT CAT GTT GG 3'
La PCR è stata effettuata tramite l' *Applied Byosystem 96000* con il seguente programma: 1 ciclo a 95°C, denaturazione per 5 minuti. 35 cicli a 94°C per 1 minuto, annealing a 58°C per 1 minuto, estensione a 72°C per 1 minuto. Estensione finale a 72°C per 5 minuti.
I seguenti ceppi di riferimento di *S. aureus* sono stati inseriti in entrambe le tecniche come controllo di qualità: ATCC 43300, *mec*A+ e ATCC 25923 *mec*A-

RISULTATI E DISCUSSIONE
Tutti gli stipiti, sensibili alla vancomicina, al cefotaxime ed all'enrofloxacina, sono risultati resistenti ad almeno 3 antibiotici tra quelli saggiati. Fra gli stipiti multiresistenti è stata riscontrata resistenza alle tetracicline (7/15), con valori di MIC superiori a 8 µg/ml, associata frequentemente a resistenza ai macrolidi (6/15) (tabella 1) , in accordo con i dati riportati da altri Autori (2,6,8,9).
L'emergenza di stipiti di *S. intermedius* multiresistenti *mec*A+ isolati da piodermite canina è già stata documentata in Europa (8), e rappresenta un segnale di allarme per le implicazioni zoonotiche possedute, dato il ruolo di *reservoir* degli animali da compagnia (4,5).
Per quanto riguarda l'indagine relativa alla resistenza alla meticillina (3), 4 stipiti sono risultati positivi per la presenza del gene *mec*A, manifestando fenotipicamente bassi livelli di resistenza, con valori di MIC talvolta inferiori ai *breakpoint* di riferimento ed aloni d'inibizione di sensibilità intermedia (11-12 mm).
La presenza di stipiti *mec*A positivi con bassi livelli di resistenza fenotipica è già stata riscontrata (11), evidenziando come per una rilevazione corretta degli stipiti MRSA/MRSI sia necessario l'utilizzo combinato delle metodiche convenzionali e biomolecolari (1,11). Infatti le metodiche convenzionali non evidenziano quei ceppi che contengono il gene *mec*A ma appaiono fenotipicamente suscettibili e possono potenzialmente divenire altamente resistenti se esposti ad antimicrobici betalattamici. Di contro le sole metodiche molecolari non

danno indicazioni sulla espressione del gene per la resistenza, che data l'elevata eterogeneità, può non essere manifesto.
Il riscontro di un'elevata frequenza di resistenza negli stipiti esaminati è probabilmente ascrivibile all'impiego di terapie antibiotiche protratte nel tempo e ripetute, che esercitano una pressione selettiva notevole, con la possibilità di nuove resistenze, o di far emergere resistenze già acquisite geneticamente ma non ancora espresse, come nel caso di ceppi *mec*A positivi ma sensibili fenotipicamente.
Considerando inoltre il rischio di trasmissione di tali stipiti multiresistenti vi è la necessità di esercitare una sorveglianza sull'antibiotico-sensibilità di ceppi batterici isolati da animali da compagnia che vivono a stretto contatto con l'uomo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Baddour M.M., AbuElKheir M.M., Fatani A.J. (2007) Comparison of *mec*A Polymerase Chain Reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant S*taphylococcus aureus*, Current Microbiology 55:473-479
2. Ganiere J P., Medaille C., Mangion C. (2005), Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma.; Journal of Veterinary Medicine 52:25-31
3. Geha, D. J., Uhl J.R., Gustaferro C.A., and Persing D.H. (1994), Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory, J. Clin. Microbiol, 32: 1768-1772
4. Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D.H. (2004), Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54:321-332
5. Guardabassi L., Loeber M.E., Jacobson A. (2004). Trasmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Veterinary Microbiology; 98:23-27
6. Hartmann F.A., White D.G., et al (2005) Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. Veterinary Microbiology 108: 119-131
7. Leonard F.C., Markey B.K.; (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. The Veterinary Journal,175:27-36
8. Loeffler A., Linek M., Moodley A., Guardabassi L. et al;(2007); First report of multiresistant, mecA-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. Veterinary Dermatology 18(6):412-21
9. ITAVARM 2003 - Monitoraggio dell'antibioticoresistenza in Medicina Veterinaria, primo report, IZS Lazio e Toscana, Centro di Referenza per l'Antibioticoresistenza
10. Performance Standard for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- NCCLS second edition -2002, M31-S1
11. Witte W., Pasemann B., Cuny C. (2007), Detection of low level oxacillin resistance in *mec*A positive *S. aureus*; Clin Microbiol Infect; 13:408-412

Tabella 1

Ceppi	Profili di Resistenza fenotipica	PCR *mec*A	MIC OX* µg/ml	DDT OX*	MIC TE µg/ml	MIC E µg/ml
S.a. 1	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.a. 2	AMP-AMC-P-Te-OT	+	4	R	>8	
S.i. 3	AMP-AMC-DA-P-Te-OT-E	+	2	I^	>8	>4
S.i. 4	AMP-AMC-DA-P-Te-OT-E	-	<0,5	S	>8	>4
S.i. 5	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.i. 6	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.i. 7	AMP-AMC-DA-P-Te-OT-E	-	<0,5	S	>8	>4
S.i. 8	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.i. 9	AMP-AMC-DA-P-E	+	0,5	I^		>4
S.i. 10	AMP-AMC-P-Te-OT	+	2	S	>8	
S.i. 11	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.i. 12	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.i. 13	AMP-AMC-P	-	<0,5	S		
S.i. 14	AMP-AMC-DA-P-Te-OT-E	-	0,5	S	>8	>4
S.i. 15	AMP-AMC-DA-P-Te-OT-E	-	0,5	S	>8	>4
S.aureus ATCC 43300		+	32	R		
S.aureus ATCC 25923		-	<0,5	S		

*Breakpoint MIC S≤2;R≥4µg/ml; DDT (aloni in mm) S≥13, I=11-12, R≤10)
^ con presenza di colonie all'interno dell'alone.

DIAGNOSI DI LEUCOSI ENZOOTICA BOVINA MEDIANTE PCR CONVENZIONALE E REAL TIME PCR: RISULTATI PRELIMINARI

Farneti S., Bazzucchi M., Casciari C., Cesarini F., Iscaro C., Marini C., Feliziani F.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Key words: Leucosi Enzootica Bovina, diagnosi molecolare, Real Time PCR

SUMMARY

Sensitive assays are required to detect proviral bovine leukaemia virus (BLV) in blood or tissue samples from cattle. We developed and optimised two qualitative PCRs to specifically detect *gag* and *env* genes and a Real Time (TaqMan) PCR assay protocol to amplify a gp51 fragment of the BLV genome. Furthermore, we evaluated comparatively the qualitative PCRs and the Real Time (TaqMan) PCR on serial ten-fold dilutions of BLV and on positive and negative field and experimental samples. The Real Time PCR showed a great sensitivity compared to both the qualitative PCRs and to the conventional serological methods and could prove to be useful diagnostic tools for BLV genome detection.

INTRODUZIONE

La Leucosi enzootica bovina (LEB) è una malattia infettiva trasmissibile sostenuta da un virus appartenente alla famiglia delle *Retroviridae.* I bovini risultano naturalmente sensibili alla malattia che si manifesta con linfocitosi persistente e/o con la formazione di linfosarcomi. Dal 1996 la LEB è oggetto di un piano nazionale di eradicazione basato sul controllo sierologico individuale dei bovini di età superiore ai 12 mesi e sulla macellazione dei capi risultati positivi. Attraverso l'applicazione di tale piano la prevalenza dell'infezione è progressivamente diminuita su tutto il territorio nazionale, al punto che la malattia è ormai ridotta ad alcune sacche "clusterizzate" e ben conosciute. In questo contesto diventa prioritaria la possibilità di confermare eventuali risultati positivi ai test di screening per evitare l'apertura di focolai di infezione sulla base di falsi positivi. La mancanza di un *Gold Standard* complica ulteriormente la problematica ed è per questo che si propone l'affiancamento di una tecnica di diagnosi diretta mediante PCR alle tradizionali prove sierologiche (1).
Nel presente lavoro si illustrano i risultati di un'attività di ricerca volta a mettere a punto l'evidenziazione dell'acido nucleico del virus della LEB attraverso la PCR e la Real Time PCR da diverse matrici: buffy coat, coagulo, siero e latte.

MATERIALI E METODI

Campioni in esame - Sono state impiegate diverse tipologie di campioni: (i) campioni positivi e negativi (diverse matrici) della nostra collezione, per la messa a punto dei metodi di estrazione ed amplificazione; (ii) cellule in linea continua di rene fetale di agnello (FLK) permanentemente infette con il virus della LEB, impiegate sia come controllo positivo di reazione, sia per determinare la sensibilità analitica dei metodi; (iii) campioni derivanti da ovini sperimentalmente infettati, utilizzati per valutare la sensibilità diagnostica dei metodi molecolari (2).
Estrazione del DNA - Il DNA genomico, comprendente anche il provirus eventualmente integrato, è stato estratto da omogenati d'organo, buffy coat e coagulo mediante applicazione di un protocollo che prevede l'utilizzo di QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Per i campioni di sangue in EDTA, il materiale è stato preventivamente sottoposto a centrifugazione e lavaggi con ammonio cloruro 0.83% al fine di ottenere i leucociti dai quali si è proceduto all'estrazione del DNA con il kit commerciale QIAamp DNA Blood mini kit, in accordo con le istruzioni fornite dal produttore. Lo stesso kit è stato utilizzato per l'estrazione del DNA da campioni individuali di latte bovino "crudo", partendo da circa $5x10^6$ cellule somatiche (5).
Per i campioni di siero, l'estrazione del DNA è stata effettuata con QIAamp UltraSens Viral kit (Qiagen) seguendo le specifiche istruzioni.
PCR convenzionale - La ricerca del provirus integrato è stata effettuata tramite due indipendenti reazioni di PCR. La prima, utilizza i primers p24 forward e reverse, specifici per una regione conservata del gene *gag* , che amplificano un frammento di 304 bp. La seconda PCR utilizza i primers gp51 forward e reverse che danno origine ad un amplificato di 380 bp del gene *env*, codificante una regione altamente conservata della glicoproteina di superficie gp51. Le sequenze dei primers utilizzati sono di seguito riportate:

Gene target	Nome primer	Sequenza primer
p24	p24 FW	5' ATATCTGA AGGGAATCGCAAC 3'
	p24 RV	5' CTGAGCTGATTGTTGGGTTAGG 3'
gp51	gp51FW	5' CTCTTCTGTGCCAAGTCTCC 3'
	gp51RV	5' CTGACAGAGGGAACCCAGTC 3'

La miscela di reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl, contenenti 1µM di ciascun primer, PCR buffer 1x con 1,25 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun dNTP, 1U Taq Platinum DNA polimerasi e 200 ng di DNA. Il profilo termico di amplificazione è stato impostato con i seguenti parametri:

denaturazione	94°C x 2'	1 ciclo
denaturazione	94°C x 30''	40 cicli
annealing	68°C x 30''	
estensione	72°C x 1'	
estensione finale	72°C x 10'	1 ciclo

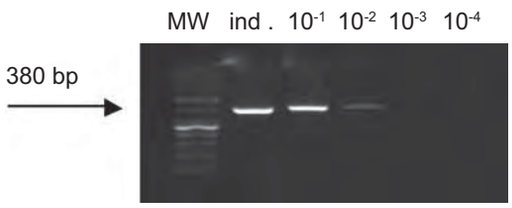
I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi in un gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro (0,5 µg/ml).
Real time PCR - La reazione di Real time PCR è stata eseguita con sistema Taqman® su ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System. I *primers* di amplificazione e la *sonda* Taqman sono stati disegnati con il supporto del software Primer Express Version 3.0 Applied Biosystem, analizzando la sequenza del gene gp51 di 138 isolati del virus della LEB presenti nel database GenBank.

RISULTATI

Sensibilità analitica - Utilizzando diluizioni logaritmiche del DNA estratto dalle cellule FLK, la PCR convenzionale permette

di visualizzare l'amplificato specifico (p24 o gp51) fino alla diluizione 10^{-2} (Fig. 1).

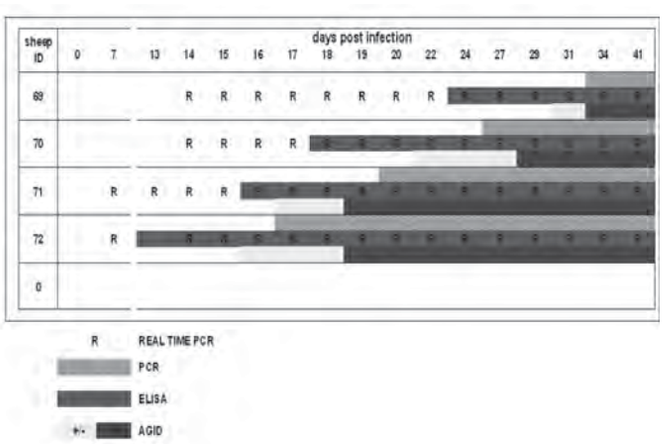
Fig 1 - *Gel di agarosio dei prodotti della PCR gp51 effettuata con diluizioni logaritmiche di DNA estratto da cellule FLK.*



La Real Time PCR è in grado di rilevare chiaramente il gene target fino alla diluizione 10^{-3}, mostrando una sensibilità analitica superiore di un fattore logaritmico rispetto al test di PCR convenzionale:

DNA FLK +	Ct (repliche) I	II	III	Ct (media)
indiluito	28.5	28.6	28.5	28,5
10^{-1}	31.8	31.9	32.1	31,9
10^{-2}	35.1	34.9	35.3	35,1
10^{-3}	37.5	37.3	38.5	37,7
10^{-4}	-	-	-	-

Sensibilità diagnostica - La Real Time PCR ha mostrato una sensibilità diagnostica superiore evidenziando più precocemente l'animale infetto, sia rispetto alla PCR convenzionale, sia rispetto ai tradizionali metodi sierologici:



DISCUSSIONE

Alla luce dei riscontri ottenuti, i metodi biomolecolari per la diagnosi di LEB presentano, rispetto ai metodi diagnostici tradizionali, alcuni vantaggi. In primo luogo quello di evidenziare, a seguito di una elevata sensibilità, gli stadi precoci dell'infezione (2, 4).
In aggiunta, la bassissima prevalenza di infezione comporta inevitabilmente un *deficit* in termini di valore predittivo positivo dei test disponibili e in questo contesto è utile disporre di un test dotato di elevata specificità, quale la Real Time PCR, per confermare eventuali risultati positivi ai test di screening .
Disporre infine di una tecnica di conferma che possa utilizzare diverse matrici presenta evidenti vantaggi pratici.
Si deve ancora approfondire l'applicabilità delle tecniche diagnostiche dirette di tipo biomolecolare per la ricerca del virus LEB dalla matrice latte. Questa tematica sarà oggetto di ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

1. Camargos M.F., Feliziani F., De Giuseppe A., Lessa L.M., Jenner K.P., J.K.P. Reis, R.C. Leite, 2007 Evaluation of diagnostic tests to bovine leukemia virus. *Revista Portugesa de Ciências Veterinárias, 102: 169-173*

2. Feliziani F., Farneti S., Casciari C., De Giuseppe A.,Vitelli F., Bazzucchi M., Marini C., Rutili D., 2009. Leucosi bovina enzootica: studio della dinamica di infezione attraverso un modello sperimentale. *3° Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria, 11-12 Giugno, Bari, 56.*

3. Kuckleburg C. J., Chase C.C.,. Nelson E. A.,Marras S.A.E., Dammen M. A., Hennings J.C., 2003. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest 15: 72-76.*

4. Martin D., Arjona A., Soto I., Barquero N., Viana M., Gomez-Lucia E., 2001. Comparative study of PCR as a Direct Assay and ELISA and AGID as Indirect Assay for the detection of Bovine Leukemia Virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 48 (2): 97-103.*

5. Murphy M. A., Shariflou M.R., Moran C., 2002. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *Journal of Dairy Research, 69: 645-649.*

DEFINIZIONE DEL CUT-OFF DI UN TEST ELISA PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA ATTRAVERSO IL METODO RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC (ROC)

Feliziani F., Costarelli S., Bartolini C., Micci E., Vitelli F., Gianfelici P., Fraticelli R., Mariotti C.

(1)*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche*

Key words: ELISA test, cut- off, ROC test, validazione

SUMMARY

Bovine leukemia virus (BLV) is a retrovirus that induces a chronic infection in cattle. Once infected, cattle remain virus carriers for life and start to show a serological reaction within a few weeks after infection. Eradication and control of the disease is based on early diagnostic and segregation of the seropositive animals.

ELISA techniques are widely used in this process and so it is important that they are validated and their performance characteristics and limitations are known.

In the past the Italian national reference laboratory for ruminants retroviruses developed a home made ELISA based on a recombinant antigen to investigate the presence of BLV antibody in bovine sera. This method was used according Italian legislation in the BLV eradication plan and in the experimental studies performed by the national reference laboratory.

In this revision we selected the positive/negative cut-off point of above ELISA test on the basis of the receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis.

INTRODUZIONE

La Leucosi Bovina Enzootica (LEB) è una malattia contagiosa che colpisce i bovini dando luogo ad una neoplasia maligna letale a distribuzione organica sistemica. L'agente eziologico appartiene alla famiglia delle Retroviridae che raccoglie virus in grado di causare forme tumorali nei mammiferi, negli uccelli e nei rettili. In questa famiglia è compreso anche il virus della human T-cell leukemia (molto simile al quello della LEB. Il virus della LEB (BLV) può determinare, dopo un lungo periodo di incubazione, un linfosarcoma. La risposta anticorpale umorale indotta dal virus non blocca la sua replicazione nell'ospite.

Dal 1996 la LBE è oggetto di un piano nazionale di eradicazione basato sul controllo sierologico individuale dei bovini di età superiore a 12 mesi e sulla macellazione dei capi risultati sieropositivi.

Le norme nazionali che regolano il Piano di eradicazione della Leucosi Bovina Enzootica e gli scambi intracomunitari sono le seguenti:

- Decreto Ministeriale 2 maggio 1996 n°358 "Regolamento concernente il piano nazionale per l'eradicazione della leucosi bovina enzootica"
- Decreto Legislativo del 22 maggio 1999 n°196 "Attuazione della direttiva 97/12/CE che modifica e aggiorna la direttiva 64/432/CEE relativa ai problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali della specie bovina e suina"

Tali norme contengono alcuni allegati tecnici in cui sono dettagliatamente descritte le prove diagnostiche da utilizzare nell'applicazione dl piano: l'immunodiffusione in gel di agar (AGID) e l'Elisa. La tecnica AGID è la prova "storica" su cui sono stati basati i piani di profilassi in Italia, ma recentemente il test maggiormente utilizzato è quello immunoenzimatico.

Il Centro di Referenza Nazionale lo studio dei Retrovirus correlati alle patologie infettive dei Ruminanti (CEREL) ha già da tempo messo a punto un kit ELISA *home made* basato su un antigene ricombinante che ha dato prova di ottime perfomance diagnostiche.

Questo test è usato nella routine dei laboratori di sierologia afferenti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche nell'applicazione dei piani di sorveglianza per LEB, ma è anche validamente usato da parte del CEREL per scopi di ricerca o per confermare di risultati di prima istanza espressi da altri laboratori nel territorio nazionale.

La mancanza di un Gold Standard richiede un'attenta valutazione dei casi dubbi che possono essere definitivamente valutati solo attraverso l'impiego di diverse prove diagnostiche.

Un metodo diagnostico dotato di un'elevata sensibilità è particolarmente apprezzabile nelle fasi iniziali di un piano di eradicazione in cui è necessario svelare rapidamente i soggetti infetti per procedere al risanamento di un'azienda o di un territorio. Nel caso della LEB, un test altamente sensibile è anche molto utile nei casi di aziende storicamente infette in cui si assiste ad uno stillicidio di positività che si succedono nel corso degli anni, magari alternate a periodi di negatività in cui la persistenza dell'infezione è mantenuta da soggetti con un basso titolo anticorpale.

In Italia la maggior parte del territorio risulta ormai indenne da LEB e anche nelle provincie che non hanno ancora raggiunto questo status la prevalenza di aziende infette è comunque molto bassa; ciò inevitabilmente comporta che il valore predittivo positivo dei test impiegati possa abbassarsi e di conseguenza si verifichino positività sierologiche in aziende già indenni da tempo. In questa situazione epidemiologica è opportuno disporre di un test dotato di un'elevata specificità appunto per adeguatamente approfondire le indagini diagnostiche dovute al riscontro di sieropositività in soggetti non supportate da evidenze epidemiologiche.

Ovviamente il CEREL deve poter disporre di un test che fornisca ampie garanzie di affidabilità per essere usato nelle situazioni sopra descritte e, di conseguenza, il test ELISA di cui si è accennato viene sottoposto a verifiche continue secondo i criteri delineati dalle norme internazionali e nel rispetto dei principi contenuti nelle norme UNI CEI EN ISO / IEC 17025.

Di seguito viene descritta l'attività di revisione della validazione del kit ELISA per la diagnosi sierologica di LEB che è stata recentemente implementata.

Materiali e metodi

Come già accennato il test ELISA è da tempo in uso presso l'IZS dell'Umbria e delle Marche. L'attività di seguito descritta non ha pertanto riguardato la revisione del il protocollo operativo del test ELISA, ma solo la modalità di interpretazione di risultati.

Inizialmente tale valutazione si basava semplicemente sul valore di densità ottica espresso dallo spettrofotometro (lunghezza d'onda 450) usato per la lettura della piastra, fissando nel valore di 0.200 il punto soglia: i sieri che superavano questa soglia erano da considerare come positivi per anticorpi indotti da BLV.

In analogia ad altri test comunemente impiegati si è voluto inserire un criterio più oggettivo adottando il seguente rapporto come strumento di valutazione:

$$\text{risultato (S/P)} = \frac{\text{DO siero in esame (S)}}{\text{DO siero Positivo di riferimento (P)}} \times 100$$

I valori soglia da utilizzare discriminare la positività o negatività di un siero sulla base del rapporto sopra esposto, sono stati definiti utilizzando il test *Receiver Operator Characteristic*

(ROC) curve: un pannello di sieri positivi facenti parte della sieroteca del CEREL e un pannello di sieri proveniente da allevamenti indenni da almeno 5 anni sono stati sottoposti al test ed i risultati ottenuti sono stati utilizzati per stimare il valore di cut-off ottimale in grado di garantire il miglior livello possibile in termini di sensibilità e specificità del metodo.
Sono stati analizzati, in differenti sedute condotte in alcuni laboratori di sierologia dell'IZS dell'Umbria e delle Marche, 3000 campioni di siero bovino ritenuti negativi per anticorpi indotti da BLV in quanto provenienti da aziende umbro-marchigiane indenni da LEB da almeno cinque anni. Sono anche stati analizzati 120 pool di campioni costituiti dalla mescolanza in parti uguali di 10 sieri prelevati da animali diversi provenienti da animali negativi.
Nei laboratori del CEREL sono stati esaminati 500 campioni positivi selezionati tra quelli che compongo la banca sieri di riferimento del Centro di Referenza. Tra questi sono stati compresi anche alcuni pool artificialmente ottenuti con mescolanze di sieri positivi e negativi: sono stati realizzati 35 pool di 10 sieri composti da 1 siero positivo e 9 sieri negativi in uguale proporzione.
Le analisi di laboratorio hanno seguito il protocollo del metodo ELISA già accreditato presso il sistema qualità dell'IZS Umbria e Marche fino alla lettura delle densità ottiche espresse dai campioni.

RISULTATI E DISCUSSIONE
Una volta eseguite le analisi di laboratorio sui sieri selezionati per lo studio, i dati ad essi realativi sono stati trasmessi al CEREL che ha provveduto ad aggregarli ed organizzarli.
Dopo aver calcolato il rapporto S/P attribuibile ad ogni siero, i dati sono stati analizzati attraverso il test ROC che ha espresso i risultati schematicamente sotto rappresentati.

Test: **Test Performance - ROC Curve** — Analyse-it
Comparison of diagnostic tests using ROC curves
s/p by risultato atteso
Performed by: CEREL — Date:

n	3500

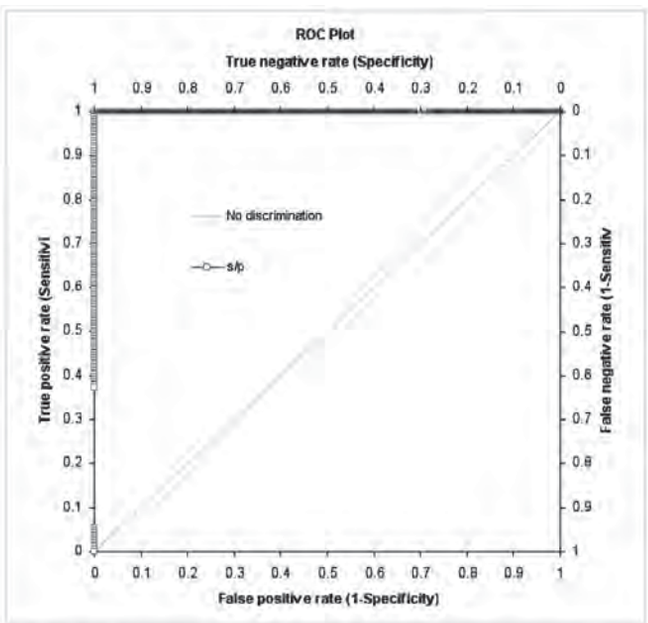
risultato atteso	n
Neg	3000
Pos	500
Prevalence	0.142

Test	Area	95% CI	SE	Z	p
s/p	1.00	1.00 to 1.00	0.000	3863.86	<0.0001

H_0: Area ≤ 0.5 H_1: Area > 0.5

Fig. 1: test *Receiver Operator Characteristic (ROC) test* applicato ai risultati espressi dal test ELISA *home made* (*output* del software Analyse-it®): campioni esaminati e valori di significatività statistica

Secondo il test effettuato, considerando un punto soglia del rapporto S/P per la definizione dei sieri negativi pari a 20 la specificità del test ELISA è stimabile pari al 99.9% con un intervallo di confidenza compreso tra 99.7 – 100% stante un livello di confidenza del 95%. In pratica solo 3 sieri, sui 3000 analizzati con risultato atteso negativo, hanno espresso valori S/P superiori a 20 e quindi sono da considerare falsi positivi.
Considerando invece un punto soglia del rapporto S/P per la definizione sieri positivi pari a 25 la sensibilità del test ELISA si può valutare ad un valore pari a 95.7 % con un intervallo di confidenza compreso tra 91.9 – 98% stante un livello di confidenza del 95%. Infatti, 21, tra i 500 sieri con risultato atteso positivo, sono stati rilevati con valore S/P inferiore a 25. Il valore della sensibilità avrebbe potuto essere maggiore ed arrivare al 99.5% non prevedendo una fascia di incertezza per i sieri che esprimono un valore S/P compreso tra 20 e 25.
In analogia con quanto previsto dai protocolli interpretativi applicati ai più comuni kit ELISA si è però voluto mantenere questo intervallo anche in considerazione che i 9 sieri non correttamente interpretati appartenevano a soggetti infettati sperimentalmente in una fase precoce di infezione e quindi, in definitiva, difficilmente riscontrabili in condizioni di campo.


ROC Plot
True negative rate (Specificity)
1 0.9 0.8 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 0
No discrimination
s/p
True positive rate (Sensitivity)
False negative rate (1-Sensitivity)
0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1
False positive rate (1-Specificity)

Graf.1: *Receiver Operator Characteristic (ROC) curve* applicato ai risultati espressi dal test ELISA *home made*

L'analisi dei pool di campioni con risultato atteso positivo ha sempre fatto registrare valori di S/P superiori a 25 e tutti i pool di campioni di soggetti BLV negativi hanno espresso valori di S/P inferiori a 20.
In definitiva si ritiene che lo studio sopradescritto, possa dimostrare che il criterio di interpretazione dei risultati basato sul rapporto tra la densità ottica espressa dal siero in esame e il siero positivo di riferimento sia opportunamente applicabile al test ELISA *home made* già in uso presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

BIBLIOGRAFIA
1. "Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay" Antonio De Giuseppe, Francesco Feliziani, Domenico Rutili, Gian Mario De Mia Clinical and diagnostic laboratory immunology. 01/02/200402/2004; 11(1):147-51.
2. "Comparison of diagnostic tests to bovine leukemia virus " Francesco Feliziani, Marcelo Fernandes Camargos, Antonio De Giuseppe, Leandro Moreira Lessa, Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Rômulo Cerqueira Leite, D. Rutili New diagnostic Technology Applications in Animal Health& Biologics Controls International Congress Saint Malo (France) 3 - 5 October 2005
3. "Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests". Greiner M, Gardner IA Prev Vet Med. 2000;45:3-22

RISCHIO ZOONOSICO CONNESSO ALLA DETENZIONE DI PRIMATI NON UMANI (NHP): ISOLAMENTO DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* DALL'INTESTINO DI UN MARMOSET COMUNE (*CALLITHRIX JACCHUS JACCHUS*)

Ferrantelli V., Vicari D., Martorana C., Macrì D., Galuppo L., Cicero A., Chetta M., Vitale F., Percipalle M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo.

Keywords: Marmoset, *Campylobacter jejuni,* zoonosi

SUMMARY

The following paper reports the isolation of a strain of *Campylobacter jejuni* from the gut of a white-tufted-ear marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*). Gross pathology and laboratory findings are reviewed along with the implications related to the zoonotic potential of the pathogen.

INTRODUZIONE

Le infezioni batteriche dei primati non umani (NHP) rappresentano le zoonosi più di frequente associate alla detenzione di questi ultimi come animali da laboratorio o da compagnia. Queste infezioni si manifestano con una gamma di malattie sistemiche particolarmente temibili come la tubercolosi o patologie gastroenteriche sostenute da microrganismi appartenenti ai generi *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* (1).
In particolare diverse specie di *Campylobacter* quali *C. jejuni* e *C. coli*, sono state spesso segnalate quali agenti di enterite nei primati (2, 3) o sono state isolate da campioni di feci nel corso di screening di routine in assenza di sintomatologia gastroenterica. Benché i sintomi clinici delle enteriti sostenute da microrganismi appartenenti al genere *Campylobacter* siano molto simili e si manifestino con diarrea acuta, febbre e dolori addominali, *C. jejuni* è considerato il maggior responsabile delle infezioni (80-90%) ed alcuni suoi sierotipi sarebbero chiamati in causa nella patogenesi della sindrome di Guillain-Barré (4, 5).
Nonostante nell'uomo la maggior parte dei casi di campilobatteriosi sia conseguente al consumo di alimenti contaminati (latte crudo, carni avicole, suine e bovine mal conservate o poco cotte) non deve essere sottovalutato il rischio di contrarre l'infezione a seguito di contatto con animali esotici che possono essere portatori di ceppi di cui non sempre sono note le caratteristiche di virulenza.

MATERIALI E METODI

Nell'ambito delle normali attività diagnostiche è pervenuta presso il nostro laboratorio una carcassa di marmoset comune (*Callithrix jacchus jacchus*) nota anche come Uistito dalle orecchie bianche. Il *Callithrix jacchus* è un primate platirrino appartenente alla famiglia dei Cebidi che viene comunemente importato ed allevato in colonie a scopo di sperimentazione e ricerca anche se è sempre più frequente l'allevamento come animale da compagnia. Come previsto dalle raccomandazioni dell'OIE per la prevenzione delle zoonosi trasmissibili dai primati non umani, l'esame necroscopico è stato eseguito presso un laboratorio autorizzato e con un livello di biosicurezza adeguato alla classe di rischio biologico dei potenziali agenti patogeni veicolati. Sulla base dell'esito dell'esame anatomo-patologico alcuni campioni di organo sono stati sottoposti ad esame colturale per la ricerca dei principali patogeni.
In particolare, campioni di intestino e di contenuto intestinale sono stati sottoposti ad esame colturale per la ricerca di enteropatogeni agenti di zoonosi quali *Salmonella*, *E. coli* e *Campylobacter*. Per l'esame colturale sono state impiegate le metodiche comunemente in uso in laboratorio per la ricerca dei batteri enteropatogeni che prevedono, dopo una fase di arricchimento, la coltura su terreni solidi selettivi, l'incubazione a 37°C e a 42°C in condizioni di aerobiosi e di microaerofilia e l'allestimento di subculture successivamente allo sviluppo di colonie dalle caratteristiche morfologiche compatibili con quelle delle specie batteriche ricercate. Sulle colonie isolate sono state effettuate prove di tipizzazione biochimica e, limitatamente al Campylobacter, di tipizzazione molecolare tramite colony PCR per l'amplificazione di sequenze corrispondenti ai siti specifici del gene 16S. I primer impiegati allo scopo sono stati il 16S1 (5'-ggttaagtcccgcaacgagcgc–3') ed il 16S2 (5'-ggctgatctacgattactagcg-3'). Le reazioni di PCR sono state condotte su Thermal Cycler Applied Biosystem 2720 utilizzando il programma d'amplificazione che fa uso di 35 ripetizioni con denaturazione a 95°C per 40 sec., annealing a 50°C per 50 sec. e polimerizzazione per 1 min a 72. I prodotti sono stato sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio per la verifica della PCR.
La sequenza del DNA, corrispondente alle regioni bersaglio, è stata determinata mediante l'analizzatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystem); le sequenze ottenute sono state allineate mediante il programma CLUSTALW 2 che utilizza un algoritmo ottimizzato per allineamenti globali di sequenze multiple.

RISULTATI

L'esame anatomopatologico eseguito su un esemplare di femmina adulto evidenziava un quadro di enterocolite diffusa con necrosi multifocale con contenuto intestinale di consistenza normale.
All'osservazione del terreno di agar Karmali si apprezzava lo sviluppo, in coltura pressoché pura, di colonie grigiastre, appiattite, umide, uniformemente diffuse lungo la linea di semina. Su terreno di agar Butzeler si osservavano colonie rosate, rotonde, convesse, lisce e lucenti, con margini regolari. L'osservazione microscopica delle colonie, insieme all'affinità tintoriale e l'esame microscopico dello striscio colorato ha permesso di attribuirne lo sviluppo a piccoli bacilli Gram-negativi, catalasi ed ossidasi positivi, mobili (osservazione su vetrino a goccia pendente). Le colonie sottoposte ai comuni test biochimici per la tipizzazione dei *Campylobacter* termofili, alla prova dell'idrolisi dell'ippurato e alle prove di sensibilità alla cefalotina e all'acido nalidixico, per differenziare *C. coli* e *C. jejuni* da *C. lari*, sono risultate ascrivibili a *Campylobacter jejuni* (Tab. 1). La conferma della caratterizzazione biochimica è stata ottenuta con il sistema di identificazione in micro metodo Api Campy (bioMerieux, Francia).
I profili di amplificazione ottenuti con la PCR e il successivo sequenziamento del DNA amplificato hanno confermato l'appartenenza alla specie *Campylobacter jejuni* delle colonie isolate.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni il numero di primati allevati come animali da compagnia o esibiti in parchi zoologici e collezioni private

di fauna selvatica è aumentato sensibilmente. Questo crescente interesse si accompagna però a nuovi allarmi di ordine sanitario che spesso si estrinsecano in una più elevata incidenza di zoonosi. Benché i pericoli maggiori, relativi alla detenzione di primati, siano principalmente legati alla possibilità di trasmissione di agenti virali infettivi per l'uomo (herpesvirus, poxvirus, virus Ebola e virus di Marburg) non andrebbe sottovalutato il rischio di trasmissione di alcune malattie batteriche come la tubercolosi, la campilobatteriosi, la shigellosi, la salmonellosi, la leptospirosi e la yersiniosi.
Nel caso oggetto di questa segnalazione, l'isolamento di *C. jejuni* pone una serie di interrogativi in materia di salute pubblica. Per le sue caratteristiche biologiche ed ecologiche, *C. jejuni* si comporta generalmente da microrganismo commensale intestinale che viene diagnosticato occasionalmente in corso di processi infettivi ad eziologia polimicrobica. I campylobacter enterici sono riconosciuti come agenti comuni di diarrea nei primati appartenenti alla famiglia *Callitrichidae* (marmoset e tamarini) e nei macachi (6) e per quanto attiene a *Campylobacter jejuni* si riportano prevalenze del 20% in marmoset affetti da diarrea (2). La maggior parte dei dati riportati in letteratura indica come *C. jejuni* sia ritenuto responsabile di forme acute e persistenti di diarrea nei primati, ma l'elevata prevalenza in soggetti apparentemente sani rende complessa l'interpretazione del suo ruolo nella patogenesi di forme enteriche croniche (7). Ciononostante non può essere escluso un suo ruolo patogenetico primario nei quadri enterici quantunque l'insorgenza di manifestazioni cliniche sia quasi esclusivamente legata alla presenza di fattori predisponenti come lo stress, condizioni di igiene precaria, deficit nutrizionali e sistemi di allevamento non idonei.
Alla luce di queste considerazioni, non va sottovalutato quindi il rischio sanitario per gli operatori o i detentori degli animali trattandosi di un agente zoonosico responsabile di sindromi dissenteriche e che in alcuni casi può essere coinvolto nella patogenesi di pericolose affezioni come la sindrome di Guillain-Barrè, una neuropatia immunomediata il cui meccanismo patogenetico è tuttora oggetto di studio e per la quale è praticabile soltanto una terapia di supporto.
È quindi importante mantenere un elevato livello di vigilanza sanitaria nei confronti di questi animali per prevenire la trasmissione all'uomo di agenti patogeni di cui spesso si ignorano le peculiari caratteristiche di virulenza, ancorché appartengano a generi ampiamente studiati e la cui diagnosi non presenta alcuna difficoltà.

Caratteristiche	C. jejuni	C. coli	C. lari
Catalasi	+	+	+
Semina in TSI agar	-	-	-
Crescita a 25° C	-	-	-
Aggl. in lattice	+	+	+
Idrolisi ippurato	+	-	-
Idrolisi acetato	+	+	-
Acido nalidixico	S	S	S/R
Cefalotina	R	R	R
(S) sensibile; (R) resistente			

Tab. 1: Test biochimici per la tipizzazione di Campylobacter

BIBLIOGRAFIA

(1) Adams S., Muchmore E., Richardson J. (1995), In Bennet B.T., Abee C.R., Henrickson R. (eds). Biosafety: Non Human Primates in Biomedical Research – Biology and Mangement. Academic Press Inc: New York. 375-420.
(2) Russel R.G., Brian D.A., Lenhard A., Potgieter L.N.D., Gillespie D., Clapp N.K. (1985). Coronavirus-like particles and Campylobacter in marmosets with diarrhea and colitis. Dig Dis Sci. 30 (12):72-77.
(3) Kalashnikova V.A., Dzhikidze E.K., Stasilevich Z.K., Krylova R.I., Kebu T.I. (2006). Campylobacter in the etiology of acute intestinal infections in primates. Vestn Ross Med Nauk. 2006 (1):6-10.
(4) Vilardo Mde C., Thomé J.D., Esteves W.T., Filgueiras A.L., de Oliveira S.S. (2006). Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of Campylobacter isolates from non-human primates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101 (5):499-501.
(5) Allos B.M., Taylor D.N. (1998). In Evans A.S., Brachman P.S. (eds), Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 3rd ed. Phenum Medical Book, New York. 169-190.
(6) Paul-Murphy J. (1993). Bacterial enterocolitis in non human primates. In: Zoo & wild animal medicine: Current therapy. Ed. M. Fowler. Philadelphia: W.B. Saunders. 344-346.
(7) Fitzgeorge R.B., Baskerville A., Lander K.P.. (1981). Experimentale infection of rhesus monkeys with a human strain of Campylobacter jejuni. J Hyg 86:343-351.

DATI PRELIMINARI DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE RELATIVE ALL'IGIENE DEL PROCESSO DI PRODUZIONE AUTOMATIZZATA DELLA PIZZA

[1]Ferrari L., [2]Di Stasio S., [1]Debiasi K., [1]Pizzo E., [1]Farina G., [1]Dalvit P., [1]Lucchini R.
[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Struttura Complessa Territoriale di Trento
[2] Sitos S.r.l. - Rovereto

Key words: pizza, igiene di processo, HACCP

SUMMARY
The aim of the study was to investigate the hygienic standards of the process for the production of pizza by an innovative machine and to evaluate the shelf life of the ingredient tomato sauce. The microbiological study was conducted in work conditions and in stress conditions (44°C - 10 days).

INTRODUZIONE

A partire dal 1999, la ditta Sitos S.r.l. ha lavorato al progetto di un'innovativa macchina automatica per la produzione istantanea di pizze. La novità della macchina consiste nel fatto di produrre la pizza in soli 3 minuti a partire da acqua, farina e prodotti freschi.
L'impianto è stato concepito a metà degli anni '90 negli Stati Uniti, ed in seguito sviluppato e messo a punto presso il *Business Innovation Centre* di Rovereto. Il sistema ha ottenuto brevetto internazionale.
Attualmente il distributore automatico di pizza è stato lanciato sul mercato nazionale ed internazionale e l'azienda sta programmando ulteriori fasi di ricerca e sviluppo finalizzate a migliorare la propria innovativa tecnologia.
Lo scopo del presente lavoro è quello di verificare e garantire le caratteristiche igienico-sanitarie della produzione, e nello specifico:

- analizzare il processo di produzione identificandone le fasi critiche;
- valutare le condizioni igieniche dell'impianto in regime di normale funzionamento;
- valutare la conservabilità degli ingredienti;
- pianificare la frequenza degli interventi di pulizia eseguiti sulla macchina;
- valutare la conservabilità della salsa di pomodoro in condizioni di stress termico.

MATERIALI E METODI

Fasi del processo

Le fasi del processo avvengono in comparti separati della macchina. Acqua e farina addizionata di lievito chimico vengono dapprima impastati in un miscelatore (mixer). L'impasto viene pressato e formato da due piastre riscaldate. Viene quindi dosato il pomodoro e aggiunti gli altri ingredienti (formaggio a pasta filata ed eventuale altra farcitura): questi ultimi sono conservati in una parte refrigerata del distributore, in confezioni monoporzione in atmosfera modificata. La cottura avviene in forno a infrarossi ad una temperatura di 380°C per un minuto circa.
Il passaggio più critico dell'intero processo è rappresentato dalla fase di miscelazione di farina ed acqua che avviene a livello del mixer: l'ambiente caldo e umido dello stesso e i residui di sostanza organica che permangono ad ogni ciclo, possono favorire la proliferazione microbica. Al fine di contenere la crescita batterica sono stati impostati cicli di pulizia interna automatici mediante produzione di impasti a perdere ogni 6 ore, mentre interventi mirati di pulizia da parte di un operatore esterno sono stati previsti in via preliminare ogni 3 giorni.

Campionamento

Il campionamento è stato eseguito dagli operatori della ditta, nella sede dell'impianto. I campioni sono stati prelevati in camera sperimentale che simula le normali condizioni di utilizzo della macchina, con temperatura media di 27°C e U.R. del 76%.
Sono stati analizzati (si vedano tabelle 1 e 2):

- materie prime (farina, salsa di pomodoro)
- impasti;
- prelievi ambientali mediante spugnette (*sponge bag)*.

Tabella 1. *Piano di campionamento - 1ª serie di analisi. (Imp=impasto, T=tampone ambientale, P=pomodoro)*

GIORNO **0**	Imp0 imp1	T0 T1	P0
GIORNO **2**	Imp2 Imp3	T2 T2' T3 T3'	
GIORNO **3**			P1 P2
GIORNO **4**	Imp4	T4 T4'	
GIORNO **5**			P3
GIORNO **7**	Imp5	T5 T5'	P4
GIORNO **10**			P5

Imp0 è stato prelevato il giorno 0, subito dopo il ciclo di pulizia, prima della messa in funzione della macchina. Imp1 è stato prelevato il giorno 0, dopo 6 ore di produzione: Imp 2 e Imp3 sono stati prelevati il giorno 2 con la macchina in normale attività, a distanza di 6 ore. Imp 4 e Imp 5 sono stati prelevati in giorni successivi. Tale campionamento aveva lo scopo di rilevare un'eventuale evoluzione microbica non controllata nell'arco della giornata di produzione e nell'arco del periodo di osservazione (10 giorni).
Nel caso dei tamponi ambientali è stata campionata l'emisuperficie destra del mixer prima dell'impasto a perdere (T), l'emisuperficie sinistra subito dopo (T').

Tabella 2. *Piano di campionamento - 2ª serie di analisi. (Imp=impasto, T=tampone ambientale, P=pomodoro)*

GIORNO **0**	Imp0	T0 T0'	P0
GIORNO **2**	Imp2	T1 T1'	
GIORNO **3**			P1 P2
GIORNO **4**		T2 T2'	
GIORNO **5**			P3
GIORNO **7**	Imp3	T3 T3'	P4
GIORNO **10**			P5

Analisi microbiologiche

Sugli impasti sono state eseguite le ricerche dei microrganismi mesofili, coliformi, stafilococchi, muffe e lieviti. Sulle sponge bag è stata eseguita la conta dei microrganismi mesofili. Sulla salsa di pomodoro sono stati eseguite le ricerche dei microrganismi mesofili**,** *Salmonella spp.***,** *Listeria monocytogenes***,** *Escherichia coli***,** clostridi, stafilococchi, lattobacilli, muffe e lieviti, ed è stata valutata l'evoluzione del pH.
Le determinazioni analitiche sono state eseguite utilizzando i metodi di seguito riportati:

- numerazione di microrganismi mesofili a 30°C secondo ISO 4833:2003;
- numerazione di coliformi a 30°C secondo ISO 4832:2006;
- numerazione di stafilococchi coagulasi positivi secondo ISO 6888-2:1999/Amd 1 2003;

- numerazione di Clostridi solfito riduttori secondo metodo interno: conta delle colonie caratteristiche in piastra di SPS secondo la tecnica dell'agar germi dopo incubazione in condizione di anaerobiosi a 37°C per 20 ore;
- numerazione di muffe e lieviti secondo metodo interno: conta delle colonie caratteristiche in piastra di RBCA secondo la tecnica della semina in superficie dopo incubazione aerobia a 25°C per 3-5 giorni;
- ricerca di *Salmonella spp.* Secondo ISO 6579:2002/Cor 1:2004 (E);
- ricerca di *Listeria monocytogenes* a 37°C secondo ISO 11290-1:1996/Amd 1 2004.
- la preparazione delle spugnette ambientali è stata condotta secondo la ISO 18593:2004, escluso punto 6.

RISULTATI

I risultati della prima serie di analisi sono riassunti in figura 1. Gli impasti hanno dimostrato una carica batterica contenuta che partendo da un valore dell'ordine di 10^4 ufc/g al giorno zero (Imp0) si stabilizza a valori dell'ordine di 10^6 ufc/g già a partire dal quarto giorno (Imp4), rimanendo costante durante i rimanenti giorni del periodo considerato (Imp5). Le muffe sono risultate assenti. La presenza di lieviti nel primo campionamento è stata ricondotta alla non pulizia del contenitore della farina, così come dimostrato dal fatto che nella seconda serie di analisi i lieviti sono risultati sempre inferiori al limite di rilevabilità del metodo. I coliformi si sono attestati a valori dell'ordine di 10^4 ufc/g e saranno oggetto di successive analisi.
Le condizioni igieniche dell'impasto sono strettamente legate alle condizioni igieniche del miscelatore. I valori di carica batterica sulle *sponge bag* eseguite sul mixer sono in accordo con quanto ottenuto sugli impasti, con un aumento della carica batterica a partire dalla situazione ottimale (giorno zero, pulizia della macchina) per stabilizzarsi a valori inferiori a 10^7 ufc/tamp (tabella 3, valori dei tamponi da T0 a T5). I valori dei tamponi T2' e T3' evidenziano un abbattimento della carica nel mixer anche di 3 log (da 5.1 x 10^6 ufc/tamp a 3.0 x 10^3 ufc/tamp, da 1.8 x 10^6 ufc/tamp a 5.3 x 10^3 ufc/tamp) anche se i tamponi T4' e T5' non manifestano lo stesso abbattimento significativo (da 3.0 x 10^6 ufc/tamp a 8.2 x 10^5 ufc/tamp, da 6.9 x 10^6 ufc/tamp a 5.2 x 10^6 ufc/tamp). Possiamo tuttavia ipotizzare un ruolo importante degli impasti a perdere nel contenimento della contaminazione microbica degli impasti.
Nella seconda serie di analisi si sono avuti risultati sovrapponibili a quelli ottenuti nella prima serie, a conferma di condizioni igieniche degli impasti e del mixer che si mantengono accettabili e costanti nel tempo.
Per quanto riguarda la conservabilità della salsa di pomodoro, le analisi hanno dimostrato una notevole stabilità del inalterato con valore di 4,20 - 4,30.
Nel pomodoro non è stata riscontrata la presenza di patogeni e non è stato evidenziato alcun tipo di crescita batterica.
Infine, lo studio della *shelf-life* della salsa di pomodoro in condizioni di stress termico ha confermato che anche in condizioni estreme (44°C) il pomodoro risulta caratterizzato da una notevole stabilità, sia dal punto di vista batteriologico che per l'acidità e le caratteristiche organolettiche, fatta eccezione per un aumento di densità della conserva.

Figura 1. *Parametri microbiologici degli impasti (scala logaritmica). Risultati prima serie di analisi.*

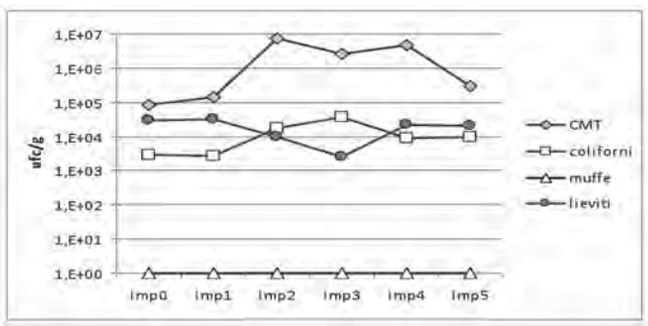


Tabella 3. *Valori dei microrganismi mesofili dei prelievi ambientali della prima serie di analisi espressi in ufc/tamp. (T = tamponi prelevati prima dell'impasto a perdere; T' = tamponi prelevati dopo l'impasto a perdere)*

T0	T1	T2	T3	T4	T5
$2,7x10^3$	$1,6x10^4$	$5,1x10^6$	$1,8x10^6$	$6,9x10^6$	$3,0x10^6$
		T2'	**T3'**	**T4'**	**T5'**
- -	- -	$3,0x10^3$	$5,3x10^3$	$5,2x10^6$	$8,2x10^5$

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno dimostrato come il sistema implementato dall'azienda garantisca condizioni igieniche dell'impianto, in regime di funzionamento normale, accettabili e costanti. In particolare, lo studio ha permesso di prolungare la frequenza degli interventi esterni di pulizia dai 3 giorni inizialmente previsti ai 7 giorni, e la frequenza dei cicli di pulizia automatica, ottenuta con impasti a perdere, dalle 6 alle 12 ore, con notevole risparmio di risorse e di materie prime.
In considerazione delle temperature di esercizio della macchina, che in alcuni punti interni possono superare abbondantemente i 30°C, si è voluto valutare la *shelf-life* della salsa di pomodoro. Le analisi sono state condotte sia in condizioni normali di esercizio (temperatura ambientale di 27°C) che in condizioni di stress termico (44°C), per un periodo di 10 giorni. I dati ottenuti hanno dimostrato come la salsa si mantenga in buone condizioni durante il periodo considerato, confermando la *shelf-life* prevista per la salsa di 7 giorni.

Riferimenti bibliografici

1. ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feedings stuffs - General requirement and guidance for microbiological examinations.
2. ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of micro-organisms - Colony count technique at 30°C.
3. ISO 4832:2006 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony count technique.
4. ISO 6888-2:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus and other species*). Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
5. ISO 7937:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of *Clostridium perfringens* - Colony count technique.
6. ISO 7954:1987 - Microbiology - General guidance forn enumeration of yeasts and moulds - Colony count technique at 25°C.
7. ISO 18593:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
8. ISO 6579:2002/Cor 1:2004 (E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp*.
9. ISO 11290-1:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection medium.

pH che durante il periodo di 10 giorni considerato è rimasto inalterato con valore di 4,20 - 4,30.

RISULTATI DEL MONITORAGGIO AMBIENTALE CON LE API NEL COMUNE DI FROSINONE

Formato G[1], Giacomelli A[1], Di Giammarino G[2], Aquilini E[1], Scaramozzino P[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana; [2]Istituto di Istruzione Superiore "San Benedetto" Professionale per l'Agricoltura e Ambiente – Frosinone.

Honey bee, heavy metal, monitoring

SUMMARY
Honey bees and bee products can be used as indicators for the environment pollution. In this article are presented the results of a monitoring carried out, during May-October 2008, for the heavy metals contamination in 7 different areas within the city of Frosinone (Italy). The matrix used where both the whole body of the bees and the honey. The results showed no significant differences for contamination among the monitoring areas, except for Pb. Significant differences were observed for the levels of several contaminants detected in the different periods of monitoring activities.

INTRODUZIONE
Il biomonitoraggio è metodo che consente di stimare gli effetti biologici dell'inquinamento ambientale mediante osservazioni effettuate su organismi sensibili. Questi ultimi, infatti, sono in grado di evidenziare, in seguito ad esposizione ad inquinanti ambientali, danni od accumuli quantificabili. Tra gli organismi che possono essere impiegati per il biomonitoraggio ambientale è possibile annoverare: i licheni, le briofite, gli anellidi, i ragni, i pesci, gli anfibi, altri animali selvatici e di interesse zootecnico, oltre allo stesso uomo. Anche insetti quali, ad esempio i coleotteri e le api, possono essere impiegati a tale scopo.
L'utilizzo delle api per il monitoraggio ambientale dei metalli pesanti è un metodo diffusamente adottato nel passato in diversi contesti (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Mentre le api sono in grado di fornire informazioni sull'inquinamento ambientale di tipo "puntiforme" nel tempo e nello spazio in quanto riportano informazioni su una esposizione riferibile al giorno della cattura (od a quelli immediatamente precedenti), il miele, essendo stato raccolto dalle api nelle settimane precedenti da diverse aree di bottinatura, fornisce informazioni sull'inquinamento ambientale relativo ad aree più vaste, nelle settimane immediatamente precedenti al campionamento.
Nel presente lavoro vengono presentati i risultati del monitoraggio ambientale con le api condotto nel 2008 su alcuni metalli pesanti nel Comune di Frosinone, con l'obiettivo di confrontare i dati ottenuti con quelli derivanti da studi analoghi in altre città e valutare eventuali differenze significative tra postazioni e tra i diversi mesi di monitoraggio.

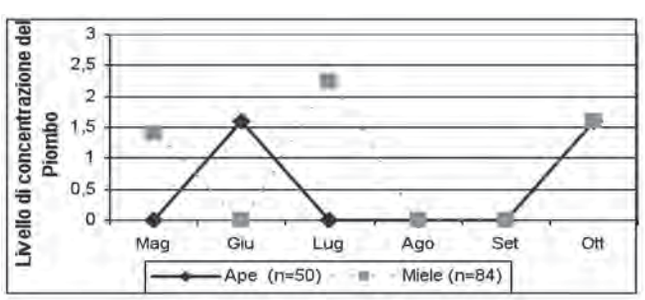
MATERALI E METODI
Lo studio è stato condotto nell'anno 2008 dal mese di maggio a quello di ottobre, su 14 alveari suddivisi in postazioni di monitoraggio di 2 alveari ciascuna e disposti in maniera tale che le api riuscissero a coprire con il loro raggio di volo (pari a circa 7 Km^2), l'intero territorio del Comune di Frosinone.
Mediante campionamenti mensili di miele ed api bottinatrici, è stato possibile valutare la contaminazione ambientale di alcuni metalli pesanti quali il cadmio, il cromo, il piombo, il rame e lo zinco. Le analisi di laboratorio sono state effettuate dal Laboratorio Diagnostico Val Comino Srl.
Per la matrice ape, ogni campione era stato costituito da 10 g di api bottinatrici (pari a circa 100 api) prelevate al loro rientro in alveare; per la matrice miele sono stati prelevati 20 g di miele non opercolato da melario (quando presente). La ricerca dei metalli è stata effettuata mediante assorbimento atomico con atomizzatore elettrotermico (EPA 7010), eccetto per il rame e lo zinco che sono stati quantificati mediante assorbimento atomico con atomizzatore a fiamma (EPA 7000B).
Ai fini dell'analisi statistica è stato effettuato il confronto tra i livelli delle sostanze in esame utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis per il confronto tra le mediane di campioni indipendenti, utilizzando come variabile di raggruppamento prima la postazione e successivamente il mese di prelievo. Il livello di significatività è stato fissato <0,05. L'elaborazione statistica è stata effettuata utilizzando il software STATA/9.

Risultati e discussione
Vengono di seguito riportati i risultati e le considerazioni relative ai diversi metalli pesanti monitorati.

Piombo

L'analisi statistica effettuata sui dati a disposizione ha evidenziato, per la *matrice "ape"*, una differenza significativa tra le postazioni (p=0,0153).
Il tasso più elevato, pari a 16,1 ppb, è stato riscontrato in un'area urbana periferica in prossimità di uno svincolo autostradale (Istituto Superiore San Benedetto); valore che, risulta comunque molto inferiore rispetto ai livelli di Pb riferiti in precedenti lavori scientifici, quando erano ancora in uso le benzine con Pb: in diverse province dell'Emilia-Romagna, i valori di Pb rilevati erano compresi tra 20 e 25.000 ppb (8); in provincia di Roma furono evidenziati tassi di piombo compresi da 610 a 1.250 ppb (2), mentre in zone soggette ad elevato traffico veicolare, la contaminazione da piombo arrivava fino a 1.400.000 ppb (6).
Anche nella matrice *"*miele*"*, i valori di piombo sono risultati inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura. L'andamento temporale della contaminazione rilevata è riportato in fig. 1. Differenze statisticamente significative tra i mesi sono state rilevate per entrambe le matrici ("ape": p=0,0124; "miele": 0,0001).

Fig. 1 – Andamento delle mediane relative al Pb



Cromo

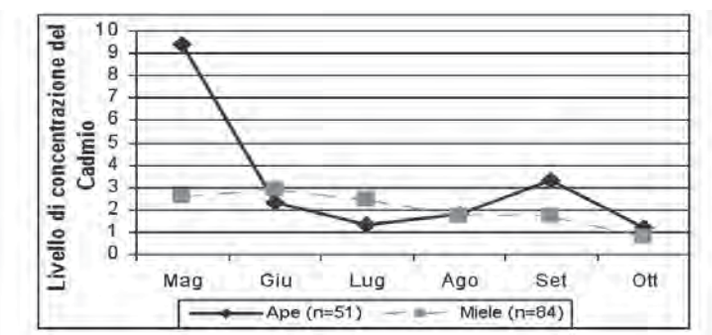
La contaminazione rilevata con la *matrice "*ape*",* nel Comune di Frosinone, se confrontata con dati di letteratura, risulta inferiore, mentre i valori nella *matrice "*miele*",* non si discostano dai risultati ottenuti da Conte e Botrè (2) e da Porrini e collaboratori (8).
L'analisi statistica non ha messo in evidenza alcuna

differenza significativa tra le mediane in base alla postazione di monitoraggio. Al contrario, l'analisi relativa all'andamento temporale ha mostrato differenze statisticamente significative per la matrice "miele" (p=0,0001).

Cadmio

I valori riscontrati nella matrice "miele", sebbene mediamente inferiori ai risultati di altri studi simili condotti nella provincia di Roma (2), hanno evidenziato dei "picchi" anomali (range da 0,4 a 220 ppb, con un valore medio di 6,1 ppb, contro un valore bibliografico che variava da 2 a 63 ppb con una media di 9,4 ppb).
I confronti effettuati tra le mediane dei dati ottenuti dalle due matrici, non rilevano differenze statisticamente significative tra le diverse postazioni di monitoraggio.
Per quanto riguarda l'andamento temporale della contaminazione (fig. 2) un valore di p=0,0166 per la matrice "ape" indica la presenza di almeno un valore che si discosta in modo statisticamente significativo dagli altri.

Fig. 2 – Andamento delle mediane relative al Pb



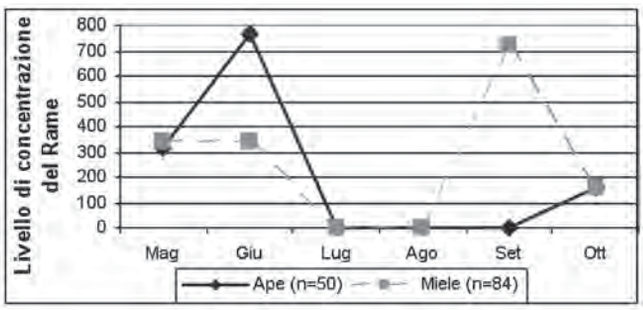
Zinco

La contaminazione media rilevata dalla "matrice ape" risulta pari a 5.290 ppb. Confrontando questi dati con il lavoro di biomonitoraggio ambientale rilevato in alcune province della Lombardia, dove le concentrazioni medie di questo metallo risultavano comprese fra 23.000 e 81.000 ppb (4), si osserva una contaminazione nettamente inferiore.
Nella "matrice miele" il valore medio è stato pari a 1.190 ppb, risultando inferiore anche a quelli ottenuti da Del Bono in provincia di Reggio Emilia (valore medio pari a 1.806 ppb), Parma (2.066 ppb) e Piacenza (1.644 ppb).
Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i livelli di concentrazioni dello zinco tra le postazioni di monitoraggio in entrambe le matrici.
I risultati dell'analisi statistica relativa all'andamento temporale della contaminazione suggeriscono differenze significative tra i mesi per entrambe le matrici ("ape": p=0,0001; "miele":p=0,0015).

Rame

Con la "matrice miele" è stato rilevato a maggio, un picco di contaminazione nella postazione 7, posizionata nell'area industriale vicina all'aeroporto, pari a 35.100 ppb. Confrontando però il valore medio (1.570 ppb) con quello di Reggio Emilia (993 ppb), Parma (560 ppb) e Piacenza (1.833 ppb) ottenuti da Del Bono nel 1998, non sembrerebbero esserci differenze sostanziali.
Non emergono differenze statisticamente significative tra le mediane tra le postazioni di monitoraggio. La fig. 3 presenta i risultati ottenuti dall'analisi statistica effettuata rispetto al tempo. I dati hanno rilevato differenze significative tra i mesi sia per la matrici "ape" (p=0,0085) sia per la matrice "miele" (p=0,0192).

Fig. 3 – Andamento delle mediane relative al Cu



CONCLUSIONI

Frosinone non sembra essere una zona particolarmente soggetta ad inquinamento ambientale da metalli pesanti.
Dall'analisi statistica non sono emerse differenze significative tra le diverse postazioni.
Sono state invece osservate, a carico delle stesse aree, differenze significative di contaminazione da mese a mese nel corso del monitoraggio.
Ulteriori studi potranno consentire una migliore interpretazione delle variazioni di contaminazione da metalli pesanti tra i diversi mesi di prelievo. Tali variazioni, infatti, potrebbero anche essere dovute a fattori climatici o ad altri fattori ad andamento variabile

BIBLIOGRAFIA

1. Baggio A., Gallina A., Mutinelli F. "Biomonitoraggio di metalli pesanti nella valutazione della qualità ambientale". Ambiente Risorse Salute XXIV: 48, 2005.
2. Conte M.E., Botrè F. "Honey bees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination", Environmental Monitoring & Assessment, 69:267-282, 2001.
3. Del Bono G., Ghidini S., Campanini S. "Metalli pesanti nel miele prodotti in Emilia", Annali della Facoltà Medicina Veterinaria di Parma, vol XIX, 1999.
4. Faccin C., Grisostolo A., Lionetti C.,Mauri L., Melgrati E.,Turri F.,Vitaliti S. "Api e miele: bioindicatori ambientali nel confronto tra un'area ad alta urbanizzazione ed un'area con insediamento aeroportuale". Il Progresso Veterinario, pag. 100 - 103. N° 3 del 2004.
5. Gallina A., Baggio A., Mutinelli F. "Contaminazione da metalli pesanti nel miele nella regione veneto: una valutazione della situazione del periodo 2003- 2004", atti del Workshop IZSLT Malattie delle api e residui nei prodotti dell'alveare", Roma 18-19 5 2006: 127-128.
6. Girotti S., Ghini S., Porrini C., Sabatini A.G., Bazzi C., Calzolai A. Honey bees as bioindicators of environmental pollution: application in Italy. Acts of the 4th International Congress on Chemistry, 13th Caribbean Conference on Chemistry and Chemical Engeneering, La Habana 16-20 april 2001.
7. Leita L., Muhlbachova G., Cesco S., Barbattini R., Mondini C. "Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination" Environm. Monitoring and Assessment. 43: 1-9, 1996.
8. Porrini C., Ghini S., Girotti S., Sabatini A.G., Gattavecchia E., Celli G. – Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy . p. 186-247. In Honey bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals (Devillers J. and Pham – Delègue M.H. Eds). Taylor & Francis, London, 2002.
9. Yazgan S., Horn H., Isengard H.D. Honey as bioindicator by screening the heavy metal content of the environment. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 2006, 102, 5, 192-194.
10. Zanolli P., Barbattini E., Frilli F., Gazziola F. Analisi del miele della città di Udine: sorgenti mellifere e inquinamento ambientale. Apoidea 2007, 4, 82-94.

IMPIEGO DI ANTIGENI SECRETORI PRECOCI E DI ESAT6/CFP10 NEL TEST ELISA GAMMA-INTERFERON IN TOPI SPERIMENTALMENTE INFETTATI CON *M.BOVIS* BCG

Forti K. [1], Mazzone P. [1], Paternesi B.[1], Curina G.[1], De Giuseppe A. [1], Bugatti M.[1], Pasquali P. [2], Cagiola M.[1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche*

[2] *Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale*

Parole chiave: tubercolosi bovina, gamma-interferon test, Antigeni ricombinanti.

SUMMARY

Eradication programmes for Bovine Tuberculosis (TB) applied in the industrialized countries are mainly based on the single and comparative skin test (IDT), isolation and slaughtering of infected animals. However, to eradicate the disease, further diagnostic tests are needed to be used *in vivo* together with IDT in order to increase sensitivity and specificity. The gamma interferon test (IFN-γ), on the bases of numerous studies, has turned out to be the best supportive test. The aim of our study was to investigate, in a murine model, the increase of the sensitivity of IFN-γ test using precocious secretory antigens in the preliminary phases of stimulations. Preliminary data showed that these innovative precocious secretory antigens do not give better results than the traditional tuberculins.

INTRODUZIONE

La politica seguita in molti paesi industrializzati per ridurre la prevalenza della tubercolosi (TB) nel patrimonio zootecnico bovino si è basata sull'identificazione degli animali che mostravano reattività alla prova di intradermoreazione tubercolinica (IDT) ed sulla loro rapida eliminazione. Per ottenere però la completa eradicazione della TB, allo stato attuale è necessario individuare test diagnostici *in vita* sensibili e specifici di supporto al metodo tradizionale ed in grado di individuare precocemente eventuali focolai di infezione. Con tali finalità da diversi anni è stato impiegato *in vita*, in affiancamento alla prova intradermica, il test del interferon-γ (IFN-γ) che rileva la quantità di citochina prodotta dalle cellule T degli animali infetti, in risposta ad una stimolazione effettuata con l'antigene tubercolare (PPD). Gli antigeni normalmente impiegati in questa fase sono le tradizionali tubercoline (PPDs) bovina ed aviare, che sono costituite da un complesso antigenico proteico, strutturale e secretorio, ottenuto da colture di micobatteri di circa 60 giorni inattivate al calore e scarsamente purificate.

Diversi studi (1,2) hanno dimostrato che il mix antigenico ottenibile nelle prime fasi di crescita dei microrganismi, differisce dal complesso proteico che si ottiene dalle colture di 60 giorni utilizzate per le PPD classiche. La diversa composizione degli antigeni raccolti nei differenti periodi di sviluppo, indurrebbe anche una diversa risposta nell'organismo ospite (3). Sulla base di questi dati abbiamo voluto verificare l'efficienza del mix di antigeni secretori raccolti nelle prime fasi di crescita del *M. bovis* AN5 quando impiegati nel test del IFN-γ. Ulteriori studi (4) condotti sugli antigeni ricombinanti ESAT6 e CFP10, hanno dimostrato che non essendo tali antigeni presenti nella maggior parte dei micobatteri ambientali e nel ceppo vaccinale *M.bovis* BCG, quando impiegati nel IFN-γ test ne aumentano la specificità,riducendo notevolmente le false positività legate all'impiego delle tubercoline tradizionali. Nella nostra indagine, utilizzando il modello murino, abbiamo voluto verificare se l'impiego del mix di antigeni secretori precoci, nella fase di stimolazione linfocitaria del test IFN-γ, sia utile nello svelare più precocemente l'infezione tubercolare rispetto agli antigeni classici.

MATERIALI E METODI

Animali e Infezione sperimentale con BCG:

Sono stati utilizzati 40 topi Swiss CD1 (20-30gr), suddivisi in 4 gruppi ciascuno composto da 5 animali di controllo e 5 animali infettati per via endovenosa, a livello della vena caudale laterale, con 0.5 mg (ca. $4x10^6$ UFC) di patina umida di *M. bovis* BCG (ceppo ATCC BCG 27291), ottenuta dopo 30 giorni di coltura in terreno Dorset-Henley modificato.

I quattro gruppi di topi sono stai sacrificati rispettivamente a 7, 14, 30 e 60 giorni dopo l'infezione per valutare l'andamento della produzione di IFN-γ.

Antigeni ricombinanti e antigeni secretori precoci:

Gli antigeni ricombinanti ESAT6/CFP10 sono stati forniti dal Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi Bovina da *M.bovis*. Il mix di antigeni secretori precoci è stato prodotto presso il nostro Istituto, coltivando *M. bovis* AN5 in Middlebrook 7H9 e poi in Dorset-Henley modificato, in agitazione continua a 37°C. La coltura batterica è stata poi centrifugata a freddo, filtrata e concentrata per ultrafiltrazione con cassetta a taglio molecolare 10 KD. La successiva determinazione proteica è stata eseguita con il metodo Kjeldahl.

Stimolazione *in vitro* e Test ELISA per IFN-γ:

Le milze dei topi sono stati rimosse asetticamente ed omogeneizzate in terreno RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) scomplementato, 100 U.I. ml^{-1} di penicillina e 10 µg ml^{-1} di gentamicina. Una aliquota dell'omogenato così ottenuto è stata utilizzata per il calcolo delle UFC, il resto della sospensione cellulare è stato incubato 5 minuti a temperatura ambiente in una soluzione lisante i globuli rossi (NH_4Cl 150 mM $KHCO_3$ 10 mM EDTA 0.1 mM). Le cellule sono state successivamente sottoposte a lavaggio ed a conta vitale microscopica con Trypan Blue.

Le cellule mononucleate sono state coltivate in un volume di 200 µl in piastre da 96 pozzetti (Corning Costard) alla concentrazione di $2x10^5$ cellule per pozzetto e stimolate con solo terreno RPMI, con terreno contenente diverse concentrazioni di PPD bovina classica (5, 10 e 20 µg ml^{-1}), del mix di antigeni secretori precoci (5, 10 e 20 µg ml^{-1}), delle proteine ricombinanti ESAT6/CFP10 (5, 10 e 20 µg ml^{-1}) e dell' anti-CD_3 alla dose di 0.25 µg ml^{-1}, usato come controllo positivo. Le colture sono state incubate per 24 ore a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2. I surnatanti sono stati raccolti e stoccati a -20°C per la successiva valutazione del IFN-γ attraverso test ELISA secondo le istruzioni del kit commerciale (R&D SystemsEurope, Ltd, Abingdon, UK).

Determinazione delle UFC:

Il numero delle UFC di M. bovis BCG rilevabili nelle milze dei topi infetti, è stato ottenuto piastrando, su terreno Middlebrook 7H11 agar (Biolife) arricchito con il 10% di supplemento OADC, diluizioni seriali degli omogenati di milza dei 5 topi sacrificati per ognuno degli abbattimenti. Le diluizioni seriali, allestite in PBS non antibiotato, sono state testate in triplo inoculando un volume di 250 µl e le piastre sono state incubate in camera umida a 37°C in atmosfera al 10% di CO_2. La valutazione del numero delle colonie è stata effettuata dopo 21 giorni di incubazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dalla numerazione delle UFC di *M.bovis* BCG ottenute dagli omogenati di milza dei topi infetti è emerso un andamento dell'infezione tubercolare ben sovrapponibile con quanto

riscontrato in bibliografia (3, 5, 6, 7). Nelle milze dei topi abbattuti a 7 giorni dall'infezione abbiamo rilevato 2 x 10^3 UFC e la massima proliferazione batterica è stata osservata a 14 giorni dall'infezione con valori che si aggirano intorno alle 6 x 10^3 UFC di *M.bovis* BCG. Ad un mese dall'infezione iniziale la carica batterica vitale riscontrata nelle milze dei topi infetti ha cominciato a decrescere, per attestarsi su valori intorno alle 4 x 10^3 UFC per poi arrivare alle 2 x 10^3 UFC ancora rilevate a due mesi dall'infezione iniziale. Questo andamento della carica microbica rinvenibile nelle milze dei topi riflette l'inizio dell'eliminazione dell'infezione dagli organi bersaglio ad opera delle cellule del sistema immunocompetente (Fig. 1).

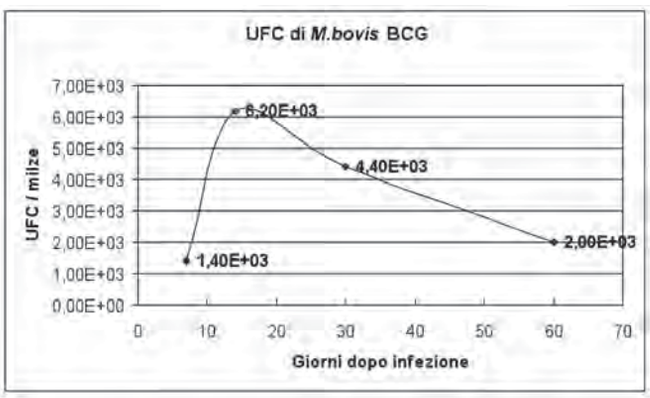


Figura 1 *Andamento dell'infezione in topi Swiss CD1 infettati con M.bovis BCG a diversi tempi post infezione. Le UFC sono state ottenute dal pool delle 5 milze ottenute per ogni abbattimento.*

Per effettuare una valutazione dei valori di IFN-γ riscontrati nei topi infetti, sono state prese in considerazione solo le stimolazioni con la massima concentrazione degli antigeni (20 μg ml^{-1}) dal momento che i dati sembrano essere più significativi. L'andamento della produzione della citochina ricalca l'andamento della proliferazione batterica ed è costantemente più alto rispetto ai topi di controllo. Infatti a 14 giorni dall'infezione si osserva la massima produzione della citochina nei linfociti stimolati con la PPD bovina classica. Anche negli splenociti coltivati in presenza del mix di antigeni precoci è stato rilevato il picco di produzione del IFN-γ alla

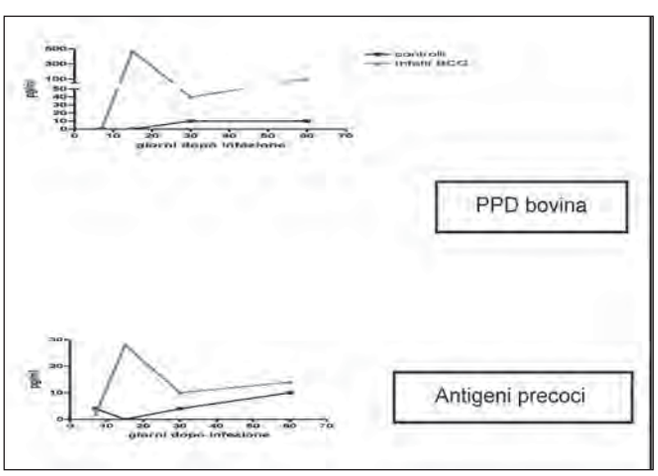


Figura 2 *Produzione di γ-IFN da parte di splenociti coltivati in presenza di PPD bovina classica e del mix di antigeni secretori precoci alla concentrazione di 20 μg ml^{-1} a diversi tempi dopo infezione di topi Swiss CD1 con M. bovis BCG.*

seconda settimana di infezione ma con livelli 10 volte inferiori a quelli riscontrati con la stimolazione con la PPD classica.
Per quanto riguarda gli antigeni ESAT6/CFP10 non è stata osservata alcuna produzione di IFN-γ da parte degli splenociti stimolati con tali antigeni in nessuna fase dell'infezione (dati non pubblicati). Dal momento che tali antigeni ricombinanti non sono espressi nel *M. bovis* BCG utilizzato per l'infezione, era prevedibile che si manifestasse la loro specificità e che i linfociti non producessero la citochina in seguito alla stimolazione *in vitro*.
Nella nostra sperimentazione quindi il mix di antigeni secretori precoci non si è dimostrato efficace nel rilevare l'infezione da *M.bovis* BCG più precocemente rispetto agli antigeni tradizionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Collins F.M., Lamb J.R., Young D.B. Biological Activity of Protein Antigens Isolated from *Mycobacterium tubrculosis* Culture Filtrate *Infect. Immun.* 1988 May;56(5):1260-6.

2. AndersenP.Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins *Infect. Immun.* 1994 Jun;62(6):2536-2544.

3. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bentzon MW, Heron I. T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1991 Apr;59(4):1558-1563.

4. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, Skjot RL, Subronto YW, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis* 2000;181:1850–1854.

5. Huygen K, Abramowicz D, Vandenbussche P, Jacobs F, De Bruyn J, Kentos A, Drowart A, Van Vooren JP, Goldman M. Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect.Immun*. 1992 Jul;60(7):2880-6.

6. Fulton SA, Martin TD, Redline RW, Henry Boom W. Pulmonary immune responses during primary *Mycobacterium bovis*- Calmette-Guerin bacillus infection in C57Bl/6 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Mar;22(3):333.

7. Biet F, Kremer L, Wolowczuk I, Delacre M, Locht C. *Mycobacterium bovis* BCG producing interleukin-18 increases antigen-specific gamma interferon production in mice. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6549.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE REAL-TIME DI *BRUCELLA SPP* IN LATTE DI BUFALA: DATI PRELIMINARI

[1]Fusco G., [1]Amoroso M.G., [1]Tavano R., [1]Corrado F., [2]Conte F., [1]Iovane G., [1]Capuano F.
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sez. Caserta;
[2] Medico veterinario Libero Professionista, Ordine dei Medici Veterinari di Caserta

Keywords: *Brucella, Bubalus bubalis,* Real-time PCR

ABSTRACT
The study describes the possibility to a employ Real-time PCR assay to detect *Brucella* spp. in a complex food matrix like raw buffalo milk. The results show that the use of an appropriate DNA extracting kit, together with the amplification of two specie-specific genes, allows to find, in a very short time (3 h), *Brucella* spp. in many cultural negative samples.

1. INTRODUZIONE

La brucellosi è una zoonosi diffusa a livello mondiale (1) ed in particolare nei paesi del Mediterraneo. L'uomo può contrarre l'infezione attraverso il contatto con animali ammalati oppure attraverso alimenti di origine animale. E' soprattutto quest'ultima la via di contagio più comune. Nella politica sanitaria della UE salvaguardare la salute dell'uomo da agenti zoonosici attraverso il controllo dell'animale e degli alimenti suoi derivati, rappresenta l'azione prioritaria. Per raggiungere il citato obiettivo, occorre effettuare il controllo delle varie fasi della filiera alimentare, abbinando, ove possibile, anche più tecniche diagnostiche per escludere la presenza di patogeni. Dalla relazione degli Ispettori dell'EFSA, l'incidenza dei casi di brucellosi umana nel biennio 2004-2005 resta ancora elevata (›1 caso su 100.000 abitanti). In Italia i casi registrati nell'anno 2006 sono stati 456 di cui 419 notificati nel Sud. Questo dato sottostima il problema reale perché non sempre le persone ammalate ricorrono alle cure ospedaliere. Nel nostro studio abbiamo ritenuto opportuno eseguire indagini analitiche per la ricerca del batterio in campioni di latte individuale di bufala mediante più tecniche: sierologica, colturale e biotecnologica, al fine di confrontarne i risultati. I campioni sono stati prelevati da capi bufalini riscontrati infetti durante le attività del Piano di eradicazione condotte sul territorio della provincia di Caserta. Contestualmente, al fine di valutare la specificità dei test, abbiamo ritenuto importante esaminare anche campioni di latte individuale prelevati da animali provenienti da un allevamento con pregressa negatività alla malattia.

2. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 60 capi bufalini di cui 40 appartenenti ad un allevamento infetto da brucellosi e 20 ad un allevamento con qualifica Ufficialmente Indenne. A ciascun capo animale è stato prelevato sia un campione di sangue che di latte. I campioni di sangue sono stati sottoposti alla ricerca di anticorpi anti *Brucella* spp mediante le prove classiche FDC e SAR-Ag:RB. I campioni di latte sono stati invece sottoposti alla ricerca del batterio mediante Real-time PCR ed esame colturale. Essi sono stati inoltre sottoposti alla ricerca degli anticorpi anti *Brucella* mediante ELISA .

2.1 Esami sierologici

I campioni di siero sono stati testati mediante le prove SAR-Ag:RB ed FDC, seguendo i metodi di prova ufficiali del Laboratorio. I campioni di latte sono stati testati per la presenza di anticorpi anti *Brucella abortus* e *melitensis* mediante kit ELISA (Pourquier ELISA brucellosis, Institut Pourquier, Montpellier, France). I risultati dell'ELISA sono stati classificati come negativi o positivi, utilizzando il cut off raccomandato dal produttore.

2.2 Estrazione del DNA e Real-time PCR

L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante 2 kit presenti in commercio: (1) NucleoSpin Food (Macherey-Nagel GmbH & Co. Düren, Germany) e (2) QIAamp mini kit (Qiagen GmbH, Hiden, Germany). Il DNA batterico è stato estratto sia da latte tal quale (400 µl) che da panna più sedimento (p+s), ottenuti mediante centrifugazione di 1 ml di latte (9700 g x15 min). La Real-time PCR è stata effettuata utilizzando due diversi kit presenti in commercio: TaqMan *Brucella* species detection kit (kit A) (Applied Biosystems, Warrington, UK) e BioDect *Brucella* spp detection kit (kit B) (Biodiversity, Brescia Italia). I DNA estratti sono stati amplificati mediante Step One Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA). Il kit A amplifica il gene *mpB* che codifica per una proteina RNasiP specifica per *Brucella melintensis abortus, canis e suis (*Applied Biosystems*,* supporto tecnico). Il kit B amplifica una sequenza conservata relativa al gene *bcsp31*, che codifica per una proteina di membrana di 31kDa (2). Come controllo positivo di amplificazione di B*rucella* spp*.* è stato utilizzato il DNA estratto da un campione di latte positivo all'esame colturale e confermato contenere *Brucella abortus biotipo 1* dal Centro di Referenza Nazionale.

2.3 Analisi batteriologica

L'analisi batteriologica è stata effettuata secondo la procedura ufficiale (OIE) (7) del Laboratorio.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Analisi sierologica del sangue e del latte

Ciascun campione di emosiero di bufalo è stato esaminato mediante le prove SAR-Ag:RB e FDC per stabilire la sieropositività del capo alla malattia. I risultati delle prove eseguite sui campioni di siero dei 40 bufali provenienti dall'allevamento infetto sono i seguenti: tutti i campioni positivi alla prova FDC sono risultati positivi anche alla SAR-Ag:RB, in particolare 19 campioni sono risultati positivi alla prova FDC con titolo 160 UI/ml, 2 con titolo 80 UI/ml, 4 con titolo 40 UI/ml, 3 con titolo 20 UI/ml ed infine 12 campioni sono risultati SAR + ed FDC negativi. Tutti i campioni provenienti dall'allevamento Ufficialmente Indenne si sono invece confermati negativi. La ricerca degli anticorpi nel latte mediante metodo ELISA ha concordato pienamente con i risultati delle prove SAR-Ag:RB e FDC.

3.2. Analisi batteriologica del latte

I 60 campioni di latte individuale sono stati testati per la ricerca di *Brucella* spp mediante analisi colturale. Dei 60 campioni analizzati solo due, appartenenti al gruppo dei 40 capi infetti, sono risultati positivi. I 2 campioni di latte provenivano da capi positivi alle prove SAR ed FDC con titolo 160/UI ml. I ceppi *Brucella* spp da noi isolati sono stati inviati al Centro di Referenza Nazionale dell' IZS di Teramo per la tipizzazione, dove sono entrambi stati identificati come *Brucella abortus biotipo 1.*

3.3. Real-time PCR

L'analisi Real-time, eseguita con i 2 kit di amplificazione sia su latte tal quale che su p+s, ha confermato l'assenza del microrganismo nei 20 campioni di latte appartenenti all'allevamento Ufficialmente Indenne. I test effettuati sui 40 campioni di latte appartenenti all'allevamento infetto ha invece dato risultati discordanti rispetto a quelli dell'esame colturale. In dettaglio, i campioni di latte, quando per l'estrazione del DNA si utilizzava il kit 2 (QIAamp mini kit), sono risultati tutti negativi, inclusi i due campioni positivi all'esame batteriologico. Gli stessi campioni, se per l'estrazione si utilizzava il kit 1 (NucleoSpin Food), hanno invece mostrato risultati a nostro avviso interessanti. In particolare, 12 campioni di latte su 40 hanno evidenziato la presenza del DNA di *Brucella* quando amplificati con il kit A. Il kit B ha confermato la presenza del batterio nei 12 campioni positivi al kit A ed ha inoltre riscontrato il DNA di *Brucella*

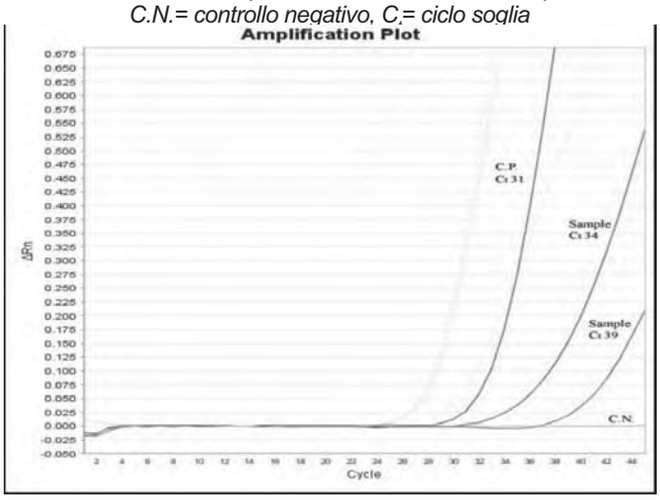
in altri 6 campioni di latte (in totale 18 su 40). E' interessante notare che il DNA del batterio è stato rilevato nei campioni sottoposti sia alla procedura di estrazione eseguita da p+s e sia da latte tal quale. Questo dato, per noi inatteso, risulta importante perché ci indica la possibilità, con il kit 1, di estrarre il DNA batterico senza dover ricorrere alla separazione di p+s. I risultati ottenuti sono riassunti in tab. 1.

Tab. 1 Detection di Brucella spp. *nei campioni di latte*

	Colturale		Real-time PCR							
			QIAamp (2)				Nucleo Spin (1)			
			bcsp31 (B)		*rnpB (A)*		*bcsp31 (B)*		*rnpB (A)*	
Allev. Inf.	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	2	38	0	40	0	40	18	22	12	28
Allev. U.I.	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20

Il dato relativo a 6 campioni risultati positivi solo con il kit B (gene *bcsp31*) e non con il kit A (gene *rnpB*), potrebbe essere spiegato come segue. In letteratura è riportato che il gene *bcsp31* target del kit B dà cross-reazione con *Ochrobactrum anthropi* e *O. intermedium* (1) microrganismi fenotipicamente e geneticamente correlati a *Brucella*. Tali batteri sono solitamente rinvenuti nel terreno (3). La loro presenza nel latte è stata invece riportata solo una volta (4) in latte di massa e con una percentuale bassissima (0.6%). Alla luce di ciò è poco probabile che possa trattarsi di questo tipo di cross reazione. Inoltre se i risultati positivi fossero dovuti a questo tipo di cross-reazione, avremmo dovuto rilevarne il DNA anche in qualcuno dei campioni provenienti dall'allevamento Ufficialmente Indenne. Il fatto che i 20 campioni suddetti siano tutti risultati negativi ci porta a rafforzare la tesi di un risultato specifico e di assenza di contaminazione da *Ochrobactrum.* In ogni caso ulteriori studi sono in corso per confermare mediante sequenziamento l'identità del gene amplificato. Pertanto, nel corso del presente lavoro, si sono quindi considerati positivi solo i campioni che hanno amplificato il DNA con entrambi i kit (12 campioni).

Fig. 1 Real-time per la ricerca di Brucella nel latte. Kit di estrazione 1, kit di amplificazione A. C.P.= controllo positivo, C.N.= controllo negativo, C$_t$= ciclo soglia



La discrepanza tra i dati dell'esame colturale (2 positivi confermati al molecolare) e quelli molecolari (12 positivi confermati da entrambi i kit) potrebbe attribuirsi alla maggiore sensibilità delle tecniche biotecnologiche rispetto a quelle colturali. Infatti, entrambi i kit presentano un limite di detection molto basso (1-10 copie di DNA) che permette di identificare anche un numero di batteri presumibilmente non rilevabile nel corso delle 6 settimane di incubazione previste dal metodo microbiologico. Quindi i 10 campioni positivi solo al molecolare potrebbero contenere un quantitativo di *Brucella* esiguo e come tale non visibile su piastra. A supporto di tale ipotesi si possono osservare i cicli soglia (C_t) ottenuti dalle curve di amplificazione (figura 1). I campioni positivi anche al colturale presentano infatti un C_t più basso (C_t 34) e quindi un maggior contenuto di DNA di *Brucella* rispetto agli altri 10 campioni che hanno un C_t medio più alto (C_t 39) e di conseguenza un contenuto di DNA specifico più basso. Un'altra spiegazione può essere basata sul fatto che la Real- time rileva la presenza anche di batteri morti o non in grado di replicarsi, mentre il batteriologico è in grado di evidenziare solo batteri vivi e vitali. Tuttavia dal momento che i campioni in questione sono campioni di latte crudo individuale, prelevati e subito analizzati, ci sembra plausibile escludere quest'ultima eventualità. Potrebbero essere altresì presenti batteri in condizione subletale (e che quindi non si replicano), laddove l'animale fosse stato sottoposto a trattamento antibiotico. I nostri risultati non si accordano con quelli riportati in letteratura (5, 6) secondo cui la detection molecolare è meno sensibile di quella colturale per campioni di alimenti (tra cui il latte). Dal momento che la sensibilità della PCR dipende essenzialmente dalla qualità e quantità del DNA estratto (6), i nostri risultati, in cui abbiamo una sensibilità del metodo Real-time di gran lunga superiore a quello colturale, sono probabilmente da attribuirsi al kit impiegato per l'estrazione del DNA (NucleoSpin Food) che ci ha probabilmente consentito di identificare la *Brucella* in 10 campioni negativi al colturale. Il suddetto kit è specifico per campioni alimentari e garantisce un buon recupero anche di DNA contenuto in quantità bassissime. Inoltre permette un recupero ottimale di DNA anche da matrici alimentari complesse, ricche di componenti quali grasso e polisaccaridi che influiscono negativamente sulla resa di estrazione e sulle successive reazioni di amplificazione (NucleoSpin Food user manual). A conferma dell'ottima performance del kit 1, abbiamo i risultati ottenuti dall'amplificazione del DNA estratto con il kit 2 (utilizzato anche da Marianelli e coll.). Infatti, impiegando il kit di estrazione 2 (QIAamp), i 12 campioni estratti con il Kit 1 positivi alla Real-time PCR, sono risultati essere tutti negativi in accordo con la letteratura (5,6). In conclusione possiamo affermare che l'utilizzo della analisi molecolare consente innanzitutto di ottenere risultati in tempi brevissimi (3 ore) rispetto all'analisi colturale (6 settimane). Inoltre l'impiego di un kit di estrazione del DNA specifico per matrici alimentari, unito all' amplificazione mediante PCR Real-time di 2 geni specifici per *Brucella*, consente di ottenere una sensibilità di detection di gran lunga superiore rispetto all'analisi batteriologica.

4. BIBLIOGRAFIA

1) Bounaadja, L., Albert, D., Chenais, B., Henault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S., Garin-Bastuji, B.,2009. Real-time PCR for identification of Brucella spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. Vet. Microbiol. 137, 156-164.

2) Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G.,1992. Detection of Brucella melitensis and Brucella abortus by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95, 271-275.

3) Delpino, M.V., Fossati, C.A., Baldi, P.C.,2004. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alpha-proteobacteria. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11, 868-873.

4) Yavarao B.M. and Wang L. 1999. A study of prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank milk. J. Dairy Sci. 82: 2620-2624.

5) Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G., Galiero, G.,2008. Evaluation of molecular methods for the detection of Brucella species in water buffalo milk. Journal of dairy science 91, 3779-3786.

6) O'Leary, S., Sheahan, M., Sweeney, T.,2006. Brucella abortus detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. Res. Vet. Sci 81, 170-176

7)OIE- Manual of standards Diagnostic Tests and vaccines cap.2.4.3. 2008.

L'AUTOMAZIONE DELLA PROVA DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO NELLA DIAGNOSI DI BRUCELLOSI NEI PIANI DI ERADICAZIONE IN REGIONE CAMPANIA

[1] Fusco G., [1]Napoletano M.,[2]Tagariello T., [1]Guarino A., [1]Bani A., [3]Ferraro A., [1]Iovane G.

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno; Sezione di Caserta

2 Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno; Sede Centrale

3 Giunta Regionale della Campania; Area Generale di Coordinamento; Assistenza Sanitaria, Settore Veterinario.

Keywords: Automated Complement Fixation Assay, brucellosis, liquid handling

ABSTRACT

In the present study the authors report about an automated Complement Fixation assay by using a workstation to detect brucellosis antibody during the programmes for the eradication of brucellosis in Campania Region (southern Italy). The tracking and tracing of the sample during testing is of ultimate importance for any laboratory aiming at quality standards. The various steps of the assay carried out by using a software specifically designed to comply with our needs originated an electronic worksheet including all the codes of the animals examined. Once printed, the results were enclosed with the analysis report and filed.

INTRODUZIONE

La normativa vigente riferita ai Piani di eradicazione della brucellosi animale, prevede l'analisi, mediante la prova di fissazione del complemento (FdC), di tutti i capi presenti in allevamento infetto che si trovino in età controllabile. Tale disposizione comporta per i Laboratori di competenza di province in cui la malattia è endemica con prevalenza elevata, un numero considerevolmente alto di prove FDC, la cui esecuzione richiede personale esperto ed addestrato. Purtroppo, anche il tecnico più esperto, quando esamina quotidianamente un numero elevato di campioni, può incorrere in errori, quali ad esempio la cattiva lettura del codice identificativo riportato sulla provetta, che consta di più di dieci numeri, col risultato di una errata registrazione dello stesso sul foglio di lavoro o nel sistema. L'automazione della prova analitica annulla non solo la problematica sopra citata ma permette di standardizzare la stessa, consentendo di esaminare tutti i campioni nelle medesime condizioni. Inoltre, se il Laboratorio opera secondo un sistema di gestione della qualità, con l'automazione della prova sierologica vengono soddisfatti più facilmente i criteri stabiliti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.
Per la buona riuscita del progetto, abbiamo ritenuto fondamentale la corretta identificazione del campione al momento del prelievo. Per tale ragione, di concerto con il Responsabile del Settore Veterinario della Regione Campania, abbiamo organizzato l'attività dei Servizi Veterinari Locali in modo da ricevere il campione ematico identificato con il corrispondente barcode riportato in BDN. Il veterinario addetto al prelievo, nella fase di pianificazione dell'attività presso l'azienda da controllare, stampa i codici identificativi di tutti i capi da controllare dell'allevamento su etichette che poi, subito dopo il prelievo ematico, apporrà sulla provetta corrispondente al capo testato. Questa procedura consente anche di evidenziare eventuali anomalie in allevamento e controllare che tutti i capi in età controllabile registrati in BDN (Banca Dati Nazionale), siano stati regolarmente sottoposti al prelievo ematico.

MATERIALI E METODI

Nella prima fase del progetto abbiamo espletato una indagine di mercato per reperire una tipologia di etichette con i seguenti requisiti: inamovibile, lavabile, resistente all'umidità e a temperature di refrigerazione e congelamento, resistente all'usura e adattabile a qualsiasi tipo di stampante.
Dall'indagine di mercato eseguita, l'etichetta con le caratteristiche richieste è risultata essere quella commercializzata dalla ditta BRADY supporto *Lasertab* Markers modello *LAT-43-707*. Per la fornitura delle etichette personalizzate secondo le nostre esigenze, abbiamo trasmesso alla ditta il layout con le dimensioni delle etichette per ottenere l'esatto formato da stampare ed apporre sulla provetta. Sempre nella prima fase, abbiamo contattato le Ditte produttrici delle apparecchiature robotiche in nostra dotazione e precisamente la Tecan, produttrice della stazione robotica *Freedom Evo 150/8*, e la Ditta Hamilton produttrice del modello *Star Lab/8*. Con entrambe abbiamo lavorato per mettere a punto un software in grado di garantire la tracciabilità e rintracciabilità del campione barcodato durante tutta la fase analitica della prova FdC.
Nella seconda fase, solo inizialmente, abbiamo provveduto a fornire alle AA.SS.LL. le etichette prescelte. Successivamente, i Servizi Veterinari hanno provveduto autonomamente ad approvvigionarsi dei supporti con le caratteristiche sopra descritte. Per l'analisi dei campioni sono stati utilizzati i software elaborati precedentemente. Per l'avvio della prova analitica, caricati i "*racks tubi madre*", identificati a loro volta mediante codice identificativo, l'operatore riporta le informazioni necessarie nella prima schermata del programma, dopo di che appare visualizzato il piano di lavoro di ciascun "*rack tubo madre"*, con gli emosieri caricati e differenziati con un colore differente a seconda del conferimento (fig. 1). Per la fase di dispensazione dei sieri diluiti e del complemento, nella schermata che rappresenta il piano di lavoro (fig. 2), appaiono visualizzati tutti i racks che costituiscono la sessione di lavoro e, per ciascun rack, tutti i capi che lo compongono con i rispettivi codici a barre e numero di accettazione. Questa schermata evidenzia anche le singole piastre che scaturiscono dal rack, ognuna identificata con un numero. Nella fase di distribuzione del sistema emolitico, la schermata che visualizza il programma di lavoro, riporta i rack corrispondenti alla sessione di lavoro con i campioni di emosiero identificati e le singole piastre che scaturiscono da ogni rack. Infine, nella fase di registrazione del risultato, il programma prevede la visualizzazione del foglio di lavoro con la specifica delle singole piastre e su queste i codici identificativi di tutti i campioni caricati. Dopo la lettura, l'operatore registra nei sopra citati fogli elettronici il risultato, che può essere archiviato nel database della strumentazione oppure esportato nel database in uso dal Laboratorio per la refertazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per evitare spese aggiuntive, abbiamo manifestato ad entrambe le Ditte produttrici, ciascuna per le proprie competenze, la necessità di poter utilizzare tutti gli accessori ("*rack tubi madre*", "*rack tubini*" ecc.) già in uso al Laboratorio. La buona riuscita dell'intero processo è subordinata necessariamente alla qualità dell'etichetta che deve essere lavabile, inamovibile dopo apposizione sulla provetta e resistente all'umidità e alle temperature di refrigerazione; se l'etichetta risulta sporca per la presenza di materiale biologico, può essere ripulita mediante panno umido senza incorrere nel rischio di strapparla, oppure rovinare la stampa del codice identificativo del capo. Per la buona riuscita dell'intero processo di lavoro e per consentire al lettore della strumentazione l'identificazione del codice, è di fondamentale importanza attenersi a semplici regole che riguarda l'applicazione dell'etichetta che deve essere applicata in senso verticale, lungo la parete della provetta, evitando di apporla in senso trasversale poiché in tal caso il lettore non potrà leggerla.

Le provette che presentano etichette con la stampa dei codici incompleta perché tagliate oppure stampate male, non saranno lette né si potrà procedere alla registrazione manuale del codice a barre del capo. Ciascun operatore che avvia la sessione lavorativa per l'esecuzione della prova sierologica in modalità strumentale, possiede una propria password ed è perfettamente individuato quale esecutore materiale della prova analitica. Nella fase iniziale di avvio, il programma prevede la visualizzazione del piano di lavoro, come illustrato in fig. 1. Nel citato piano, ogni conferimento, identificato da un numero di richiesta, è rappresentato sui "*rack tubi madre"* da un colore diverso che differenzia ogni singolo allevamento. In questa fase l'operatore effettua un ulteriore controllo, non solo del totale dei capi analizzati per ogni singola richiesta, ma anche del totale dei capi esaminati nell'intera sessione lavorativa. Nella fase successiva di distribuzione in piastra del campione diluito nonché del complemento ed antigene, il software visualizza ogni singolo rack nonché le singole piastre in cui sono stati deposti i sieri con i corrispondenti codici identificativi degli animali. La medesima visualizzazione si ha nella fase di distribuzione del sistema emolitico. Nella fase di lettura, infine, il programma visualizza il foglio di lavoro elettronico con la specifica della posizione di ciascun capo identificato con il corrispondente codice a barre. Dopo la lettura, l'operatore registra il risultato nel foglio di lavoro, necessario per le fasi successive di refertazione. Il risultato del dato analitico viene reso immodificabile e archiviato così che, in caso di contestazioni, quali ad esempio la notifica da parte dell'Utenza per una non corretta associazione del capo al numero di richiesta, circostanza possibile in caso di presenza di più sottoattività con codice di stalla unico, è possibile effettuare verifiche e rintracciare il campione. In un Laboratorio in cui vige il Sistema Qualità, l'automazione sicuramente consente non solo di standardizzare la prova, ma soprattutto di annullare errori da parte dell'operatore. Il Sistema Qualità prevede necessariamente di compilare i fogli di lavoro con i codici identificativi degli animali esaminati e qualsiasi soluzione individuata in deroga a questo aspetto, rappresenta un modo approssimativo per evitare di trascrivere numeri, per cui la soluzione raccomandata resta sempre quella di riportare il codice a barre di ciascun soggetto esaminato. Con l'utilizzazione dell'automazione tutti i descritti punti critici si annullano ed è possibile infine esportare i risultati di tutti i campioni esaminati, sia i positivi sia quelli negativi, nel database per la refertazione. Altro vantaggio dell'automazione, utilizzata da laboratori di province dove la malattia presenta una elevata prevalenza e sono numerosi gli allevamenti che richiedono l'analisi di tutti i capi conferiti con la prova FDC, è quella di far fronte a situazioni di emergenza dovute al conferimento di un numero elevato di emosieri. Diversamente, l'adeguamento del personale al carico di lavoro, in tempi brevi, non è sempre possibile quando il laboratorio è accreditato e per l'esecuzione delle prove deve avvalersi, necessariamente, di personale qualificato e formato. Nel nostro Laboratorio la prova strumentale di FDC viene eseguita come screening su tutti i campioni di emosiero conferiti e quando questi ultimi risultano positivi, si esegue la prova FDC con metodo manuale per la conferma del titolo finale, mentre gli emosieri risultati negativi vengono refertati sull'esito della prova strumentale.

BIBLIOGRAFIA

1.Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. 1988. techniques for the brucellosis laboratory INRA Paris.

2.D.M. 27 agosto 1994 Nà 651. regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini. Pubblicato sulla GU del 26/11/1994 n° 277

3.OIE- Manual of standards Diagnostic Tests and vaccines cap.2.4.3, 2000.

4.O.M. del 14 novembre 2006. Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovina e caprin, leucos in Calabria,Campania, Puglia e Sicilia. GU del 7 dicembre 2006 n°285

Fig. 1: Visualizzazione rack con n° richieste accettazione differenziate da colori differenti

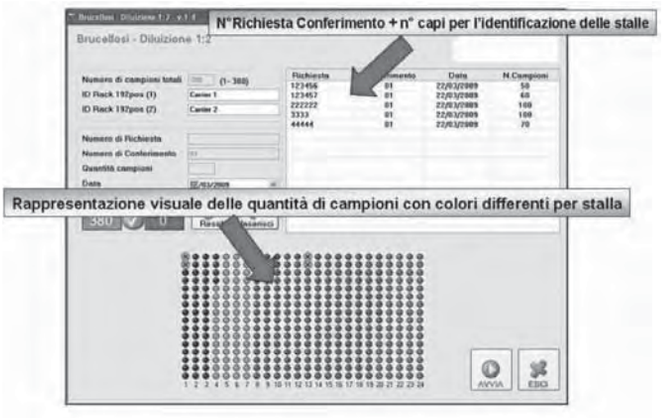

N°Richiesta Conferimento + n° capi per l'identificazione delle stalle
Rappresentazione visuale delle quantità di campioni con colori differenti per stalla

Fig. 2: piano di lavoro con visualizzazione del rack, campioni con codice a barre, n° richiesta accettazione e piastre di ciascun rack

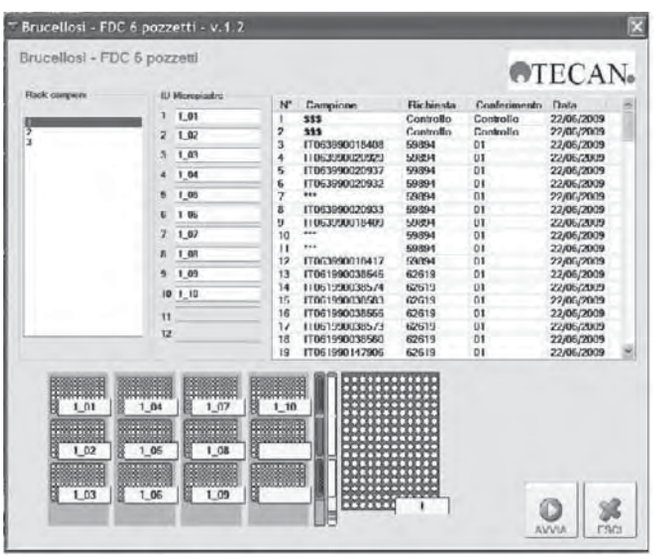
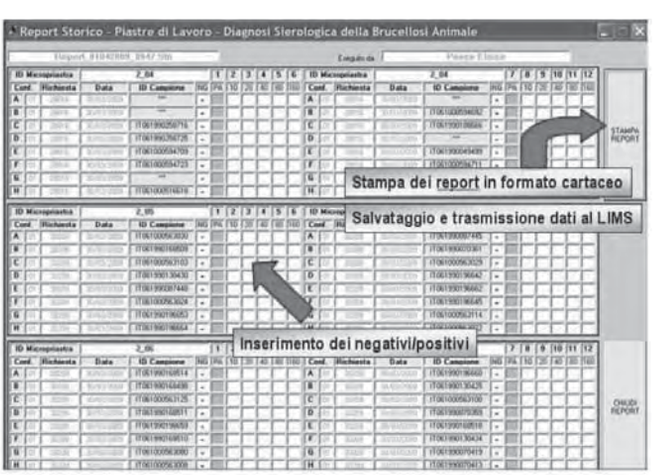


Fig 3: Foglio di lavoro elettronico con la visualizzazione delle piastre per la registrazione risultato


Report Storico - Piastre di Lavoro - Diagnosi Sierologica della Brucellosi Animale
Stampa dei report in formato cartaceo
Salvataggio e trasmissione dati al LIMS
Inserimento dei negativi/positivi

LE CIANOTOSSINE NELLE ACQUE DOLCI E NEI PRODOTTI ITTICI: RISCHI PER LA SICUREZZA ALIMENTARE E MODERNE STRATEGIE DI MONITORAGGIO

Gallo P.[1], Ferranti P.[2], Fabbrocino S.[1], Guadagnuolo G.[1], Bruno M.[3], Serpe L.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Chimica, Via Salute 2, 80055 Portici (NA);*

[2] *Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Via Salute 2, 80055 Portici (NA);*

[3] *Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma*

Keywords: cianotossine, spettrometria di massa, sicurezza alimentare

INTRODUZIONE

I Cianobatteri, noti anche come alghe blu-verdi, sono procarioti che producono fioriture nelle acque dolci e salmastre. Le fioriture si presentano in genere in maniera estesa, a volte con colori appariscenti; questi fenomeni, osservati in tutto il mondo, con periodicità ciclica, sono essenzialmente dovuti all'eutrofizzazione di laghi, fiumi e bacini. Le fioriture sono causate da diverse specie batteriche, per la maggior parte appartenenti ai generi *Microcystis, Planktothrix, Anabaena, Nostoc, Nodularia, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis*. Alcuni di questi cianobatteri producono metaboliti secondari, noti come cianotossine, che possono essere tossiche per gli animali selvatici, gli animali da reddito e per l'uomo (2). Le cianotossine più note e più nocive sono le microcistine (MC), una famiglia di più di 90 varianti di eptapeptidi ciclici che hanno mostrato effetti genotossici, epatotossici e nefrotossici nei mammiferi (1,9), nonché attività come promotori tumorali (4). L'esposizione alle MC può avere effetti sub-letali, che hanno causato diversi episodi di intossicazione dei consumatori. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha stabilito per la MC-LR un livello di Dose Giornaliera Tollerabile (Tolerable Daily Intake, TDI) di 0.04 µg/kg di peso corporeo/al giorno per l'uomo (10); un limite massimo provvisorio di 1 µg/l è stato indicato per le acque potabili. I cianobatteri producono anche molte altre cianotossine, ovvero la cilindrospermopsina, le anabaenopeptine, le aeuruginosine ed aeruginosidi, le microviridine, le microginine, le cianopeptoline, l'anatossina-a, le nodularine, la lyngbyatossina e composti analoghi della saxitossina (7). Le cianotossine, sulla base della struttura molecolare, sono classificate come peptidi ciclici o alcaloidi, e possono avere diverso grado di tossicità. Tra le più interessanti, l'alcaloide cilindrospermopsina (CYL) è cancerogeno e genotossico. In generale, quasi tutte le cianotossine sono caratterizzate da elevata variabilità strutturale. Nel caso delle microcistine, questa variabilità è dovuta soprattutto all'identità dei due L-amminoacidi del ciclopeptide, e alla presenza di des-metilazioni e/o acetilazioni. La presenza di cianobatteri nelle acque interne utilizzate per l'approvvigionamento idrico, ma anche per la pesca, le attività di acquacoltura e l'abbeveraggio degli animali, è un problema emergente in tutto il mondo, perché le cianotossine prodotte possono arrivare all'uomo attraverso il consumo di acqua potabile e prodotti ittici contaminati, oltre che tramite l'aerosol. In presenza di elevate concentrazioni in acqua sono stati registrati episodi di intossicazione acuta nell'uomo, dovuta soprattutto alle microcistine (6), ma anche alla cilindrospermopsina (3). Fenomeni di morte su larga scala della fauna selvatica e di allevamento a causa delle microcistine sono stati descritti spesso in letteratura (8). Per le MC la legge italiana ha fissato un limite di 0.84 µg/l di microcistine totali per le acque dolci (5), allo scopo di prevenire eventuali intossicazioni laddove si svolgono attività di ricreazione e natatorie. Le fioriture di cianobatteri nelle acque dolci sono state comunemente osservate in Italia durante gli ultimi anni, pertanto è estremamente importante controllare i rischi per la salute dei consumatori che derivano dall'assunzione delle biotossine attraverso alimenti ed acque contaminati. La disponibilità di metodi di prova e di strategie analitiche moderne ed efficaci, basate sulla spettrometria di massa, rappresentano uno strumento essenziale per caratterizzare la presenza di queste biotossine e valutare eventuali rischi per la sicurezza alimentare dei consumatori.

MATERIALI E METODI

La CYL (30 µM) è stata fornita dal National Research Council (Canada). MC-LR, MC-YR e MC-RR sono state fornite dalla DHI Water and Environment (Danimarca); MC-LF e MC-LW sono state fornite dalla Vinci Biochem (Vinci, Italia). Le colonne SPE HLB-Oasis (500 mg, 6 mL) sono state fornite dalla Waters (USA).

Sistema Ion trap LC/ESI-MS/MS costituito da Surveyor LC Plus pump, autosampler, LCQ Advantage MS (Thermo Fisher). Sistema MALDI-ToF/MS system Voyager DE-PRO (PerSeptive Biosystems). Le matrici usate sono acido α-ciano-4-idrossicinnamico e acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB) (Fluka). Sistema LC/ESI-Q/ToF/MS-MS Ultima, con sorgente ionica electrospray NanoLockSpray e cromatografo CapLC (Waters, USA).

I campioni di cianobatteri (50 ml in volume) sono stati lisati e il contenuto cellulare analizzato mediante ion trap LC/ESI-MS/MS, MALDI-ToF/MS e LC/ESI-Q/ToF-MS/MS.

I campioni di acqua sono stati purificati su colonne HLB-Oasis (Waters), e ripresi in 1 ml acqua MilliQ per l'analisi ion trap LC/ESI-MS/MS, MALDI-ToF/MS e LC/ESI-Q/ToF-MS/MS.

I campioni di muscolo e visceri di pesce sono stati estratti con solvente organico, purificati mediante SPE su colonne HLB-Oasis e ripresi in 1 ml metanolo per l'analisi ion trap LC/ESI-MS/MS, MALDI-ToF/MS e LC/ESI-Q/ToF-MS/MS.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati sviluppati metodi di conferma per l'identificazione di cianotossine in estratti algali, acqua, pesci, crostacei. In particolare, per le analisi di conferma sono state utilizzate tecniche strumentali basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS), impiegando diversi rivelatori, sia di uso comune, come triplo quadrupolo e trappola ionica, ma anche più sofisticati, come il MALDI-ToF (Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight), e soprattutto uno spettrometro ibrido, il Q-ToF (Quadrupole-Time of Flight). I metodi sviluppati sono in grado di rivelare la presenza delle microcistine MC-RR, MC-LR, MC-YR, MC-LF, MC-LW fino a concentrazioni molto basse, comprese tra 0.1–1.0 µg/l in acqua e 0.1–5.0 µg/kg in tessuto muscolare di pesci e crostacei.

L'analisi MALDI-ToF/MS e LC-Q-ToF/MS/MS sono risultate particolarmente efficaci nell'individuare i profili di contaminazione da cianotossine, permettendo di individuare simultaneamente biotossine appartenenti a diverse classi. In Figura 1 e Figura 2 sono riportati, rispettivamente,

uno spettro MALDI-ToF e un LC-Q-ToF/MS/MS total ion chromatogram (TIC) di una miscela standard di 5 MC. Mediante la combinazione di queste tecniche, sono state identificate le biotossine prodotte dai cianobatteri presenti nei Laghi d'Averno (MC, CYL, anabaenopeptine, microviridine), di Massaciuccoli (MC), Albano (MC, CYL, aeruginosine, aeruginosidi), di Vico (MC), di Pergusa (CYL). Complessivamente, sono stati individuati diversi tipi di microcistine; in particolare, la tecnica LC-Q-ToF/MS/MS si è dimostrata di particolare efficacia per l'analisi qualitativa e quantitativa, ed ha consentito di caratterizzare la struttura molecolare di una nuova variante della MC-RR mai descritta in precedenza, identificata nel Lago d'Averno (acetil-Adda-MC-RR). Inoltre, è stata confermata mediante spettrometria di massa la presenza della cilindrospermopsina (CYL) nei laghi italiani.

Le MC e la CYL sono state rivelate in campioni di acqua raccolti in alcuni laghi del Nord, Centro e Sud Italia, fino ad una concentrazione totale di 1.1 µg/l. Inoltre, sono stati analizzati campioni di pesci e crostacei raccolti in alcuni laghi del Centro e Sud Italia, dove è stata rivelata la presenza di microcistine in concentrazioni fino a 27 ng/g in muscolo di cavedano, 2746 ng/g in visceri di muggine, 74 ng/g in testa di gambero, 12 ng/g in muscolo di gambero, provando il fenomeno della bio-magnificazione di questo tossine nei prodotti ittici, con il rischio di arrivare sulla tavola del consumatore.

Per una corretta valutazione dei rischi per i consumatori dovuti alla presenza di cianotossine, è necessario individuare le sostanze prodotte durante la fioritura, la loro eventuale concentrazione e persistenza nel tempo nell'acqua e nei prodotti ittici. Con tale obiettivo, è stata sviluppata una metodologia operativa che mira, complessivamente, a caratterizzare le cianotossine prodotte nell'ambito della fioritura, analizzando un estratto della massa batterica mediante MALDI-ToF/MS; in questo modo, sono individuate le cianotossine prodotte ed eventuali varianti (forme des-metilate, acetilate, ecc.). La presenza di tossine poco comuni o non ancora descritte in letteratura è studiata mediante LC-Q-ToF/MS/MS; l'identificazione e quantificazione delle singole cianotossine consente di valutare il rischio sulla base della loro tossicità relativa. La presenza delle cianotossine può essere quindi determinata in modo mirato nell'acqua e nei prodotti ittici del corpo idrico contaminato; inoltre, la permanenza di queste biotossine può essere monitorata nel tempo, fino ad osservare la scomparsa della contaminazione e la deplezione dai tessuti dei prodotti ittici. La strategia analitica ed i metodi di prova sviluppati rappresentano uno strumento diagnostico rapido ed efficace per caratterizzare il profilo delle cianotossine prodotte e adottare le misure di prevenzione necessarie a ridurre i rischi per la sicurezza alimentare del consumatore, in funzione della durata della fioritura dei cianobatteri e della scomparsa delle tossine dall'acqua e dai prodotti ittici presenti nel corpo idrico.

ABSTRACT

Cyanotoxins, produced worldwide by cyanobacteria growing in eutrophic freshwaters and brackish waters, are hepatotoxic, nephrotoxic, genotoxic compounds, causing both lethal and sub-acute poisoning to fauna and humans. Confirmatory ion trap LC-MS/MS, MALDI-ToF/MS and LC/ESI-Q-ToF-MS/MS methods have been developed to determinate cyanotoxins in bacteria extracts, freshwaters, muscle and viscera from fish and crustaceans. The analytical targeted strategy we developed for monitoring cyanotoxin outbreaks represents an effective tool for food safety risk assessment and consumer's protection.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1 Bouaicha N, Maatouk I, Plessis MJ, and Perin F, Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. Environ. Toxicol. 2005; 20, 341-347.
2 Carmichael WW, The toxins of cyanobacteria, Am. Sc., 1994; 270, pp. 78-86.
3 Griffiths DJ., Saker ML. 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. Environ. Toxicol. 18(2):78-93.
4 IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 94. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008..
5 Ministero della Salute, Circolare Ministero Sanità 31/7/1998 IX.400.4/13.1/3/ 1447, 1998.
6 Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, The Lancet , 1998; 352, 21-26.
7 Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. Mol. Nutr. Food Res. 2007; 51, 7 – 60
8 Ressom R, Soong FS, Fitzgerald J, Turczynowicz L, El Saadi O, Roder D, Maynard T, Falconer I. Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). Canberra: National Health and Medical Research Council/Australian Government Publishing Service; 1994.
9 Welker, M; Von Dohren, H. Cyanobacterial peptide – nature' own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiol Rev 2006 30, 530 -563.
10 WHO. Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd ed. Addendum to Vol 2, Health Criteria and Other Supporting Information. Geneva: World Health Organization, 1998.

Figura 1. Spettro MALDI-ToF/MS di 5 MC standard a 10 ng/ml.

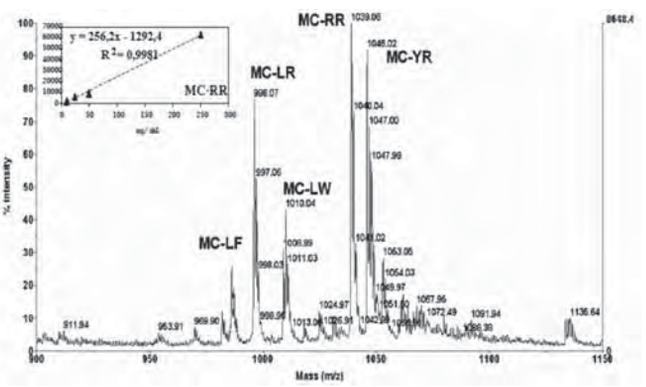
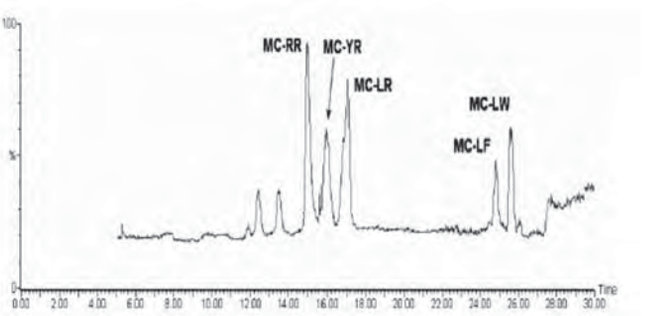


Figura 2. Total Ion Chromatogram LC-ESI-Q-ToF-MS/MS di 5 MC standard a 1 ng/ml.



DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI *NEOSPORA CANINUM* NEI BOVINI: MONITORAGGIO IN PIEMONTE NEL PERIODO 2008-2009

Garrone A., Sant S., Fulghesu L., Monnier M., Lai J., Callipo M. R., Bergagna S., Rossi F., Dondo A., Goria M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Key Words: *Neospora caninum*, PCR simplex, monitoraggio

SUMMARY
Neospora caninum is one of the most widespread agent of infectious bovine abortion in the world. The aim of this study is to observe the presence of *Neospora caninum* in biological samples derived from bovine aborted foetuses during the period 2008-2009.

INTRODUZIONE

La neosporosi è una malattia parassitaria largamente diffusa in tutto il mondo ritenuta una importante causa di aborto del bovino con possibili ripercussioni di carattere sanitario ed economico per il comparto zootecnico.
Essa è causata da un protozoo, *Neospora caninum*, **affine morfologicamente e antigenicamente a** *Toxoplasma gondii.*
I bovini possono acquisire l'infezione mediante trasmissione orizzontale, in seguito a ingestione di alimenti o acqua contaminati con oocisti eliminate dalle feci dell'ospite definitivo (2, 4) o come accade più frequentemente con modalità verticale, attraverso la trasmissione transplacentare di tachizoiti dalla madre infetta al feto durante la gravidanza (1).
Il sintomo principale che si manifesta nel bovino adulto è l'aborto a cui si accompagna spesso una riduzione della produzione di latte (5). I vitelli nati a termine che acquisiscono l'infezione congenita generalmente non manifestano sintomi evidenti della malattia, raramente possono mostrare disturbi neurologici.
La presenza persistente di aborti (>5%) in un allevamento rivela una forma endemica della malattia dovuta alla trasmissione madre-feto; una comparsa improvvisa di un'elevata percentuale di aborti (anche 30-40%) intorno al 4°-6° mese di gravidanza indica invece una forma epidemica legata alla presenza di cibo e acqua infetti (3).
L'accertamento diagnostico per neosporosi è ormai entrato nel novero degli esami di laboratorio che vengono routinariamente eseguiti per la ricerca di agenti infettivi e parassitari possibili causa di aborto nel bovino e prevede l'utilizzo di tecniche dirette (esame istologico, immunoisto-chimica, biologia molecolare) ed indirette (ELISA, IFI) .
Tra le tecniche dirette, quelle biomolecolari basate sulla amplificazione di segmenti specifici del genoma del parassita mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) trovano largo impiego per la ricerca dell'agente infettivo. Esse infatti sono specifiche e sensibili, non richiedono la vitalità del parassita nei tessuti, possono essere applicate su campioni congelati, e consentono di disporre di un esito in tempi brevi.
I campioni risultati idonei per la diagnosi biomolecolare sono il fegato, il rene, il sistema nervoso centrale (SNC) del feto abortito e la placenta della madre, tessuti in cui l'esame immunoistochimico ha rivelato più spesso la presenza di *Neospora caninum*.
Lo scopo del presente lavoro è quello di monitorare la diffusione dell'agente infettivo negli allevamenti piemontesi negli anni 2008-2009 mediante l'impiego di un test validato di simplex PCR (6,7), e di valutarne la presenza nelle varie tipologie di campioni di tessuto degli organi bersaglio.

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO
Nell'arco temporale che va dal 01/01/2008 al 30/06/2009 sono pervenuti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta 993 campioni di organi appartenenti a 337 feti bovini con richiesta di approfondimenti diagnostici sull'eziologia dell'aborto. Nella maggior parte dei casi, da ciascun feto sono stati prelevati i tre organi d'elezione, in 33 casi è pervenuta anche la placenta della madre. In due animali è stata prelevata esclusivamente la placenta e in un feto un pool di organi. Il dettaglio dei campioni analizzati è riportato in Tabella 1

Tabella 1. Dettaglio dei campioni analizzati

tipologia	numero
fegato	319
rene	313
SNC	325
placenta	35
pool	1
Totale	993

RICERCA DI *Neospora caninum* IN CAMPIONI DI TESSUTI D'ORGANO DA FETI ABORTITI MEDIANTE SIMPLEX PCR
La diagnosi molecolare di *Neospora caninum* è stata effettuata applicando il metodo descritto da Muller N. *et al* (1996) (7) e validato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (6) basato sul rilievo di un segmento della regione Nc5 del genoma di *Neospora canimum* attraverso l'impiego dei primers Np6 e Np21 . Per aumentare le potenzialità diagnostiche la ricerca di DNA di *Neospora caninum* è stata condotta su tre differenti tipi di tessuto prelevati (fegato, reni, SNC) e, quando possibile, anche su placenta.
Il DNA genomico è stato estratto dai tessuti in esame utilizzando kit disponibili in commercio adatti allo scopo e successivamente quantificato mediante lettura spettrofotometrica a una lunghezza d'onda di 260 nm.
Il DNA estratto è stato quindi amplificato, dopo essere stato aggiunto alla miscela di reazione [dNTPs 0.2 mM ciascuno, $MgCl_2$ 1.5 mM, PCR buffer 1x, primers Np21-Np6 25µM, Fast start *Taq* polimerasi 1.25 U (Roche), volume finale 50 µL] in quantità compresa tra 50-300 ng per reazione in un volume di 5 µl, in termociclatore GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) secondo i seguenti cicli termici: 40x (94±0,15°C/1 min, 63±0,15°C/1 min, 74±0,15°C/3,5 min), estensione finale 74±0,15°C/10 min e raffreddamento a 4°C.
Il DNA amplificato è stato visualizzato tramite corsa elettroforetica su gel di agaroso al 2% colorato con sybr safe 1x (Invitrogen) .

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 337 feti su cui è stata effettuata l'analisi nel biennio 2008-2009, 72 (21.4%) sono risultati positivi per la ricerca di *Neospora caninum* mediante simplex PCR. Su 993 campioni

analizzati, 133 sono risultati positivi (13,4%) e il dettaglio dei risultati, relativamente agli animali con riscontro di positività, è riportato in tabella 2.
Negli animali risultati positivi di cui sono pervenuti i 3 tessuti fetali (rene, fegato e SNC) le positività maggiori si sono riscontrate prevalentemente nel SNC (58 campioni: 85%) e in misura leggermente inferiore nel rene (43: 62,3%), il fegato è risultato positivo solo in 21 campioni (30%). Tranne che in un caso le placente sono risultate sempre positive (10: 90,9%) . Il pool di organi è positivo

Tabella 2. Dettaglio campioni positivi

ANIMALI POSITIVI	ORGANI POSITIVI				
	fegato	**rene**	**snc**	**placenta**	**pool**
4	+	+	+	+	
1	+	+	-	+	
1	-	+	+	+	
1	-	-	+	+	
1	-	-	+	-	
1	-	-	n.p.	+	
14	+	+	+	n.p	
16	-	+	+	n.p	
21	-	-	+	n.p.	
6	-	+	-	n.p.	
2	+	-	-	n.p.	
1	-	n.p.	-	+	
1	-	+	n.p.	n.p.	
1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	+
1	n.p.	n.p.	n.p.	+	n.p.
Totale campioni positivi: 72	21/70	43/69	58/68	10/11	1/1

La ricerca di DNA di *Neospora caninum* eseguita mediante simplex PCR presso l'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta nel biennio 2008/2009 ha permesso di rivelarne l'ampia diffusione negli allevamenti piemontesi (21,4% dei feti pervenuti), confermando questo patogeno tra le principali cause di eventi di aborto infettivo nei bovini. Dai risultati ottenuti si può osservare come gli organi di maggior rilievo diagnostico siano rappresentati dal SNC e dal rene e in misura inferiore dal fegato. Tuttavia poiché si sono riscontrati complessivamente 8 casi in cui la positività è stata evidenziata solamente in uno dei tre campioni d'organo, rispettivamente nel fegato in 2 casi e nel rene in 6 casi, è importante per massimizzare le potenzialità diagnostiche del sistema continuare ad effettuare la ricerca sul pannello dei tre tessuti d'organo. Tuttavia è necessario evidenziare che in un caso solo, anzichè gli organi separati è stato conferito un pool degli stessi e questo è risultato positivo. Ulteriori approfondimenti pertanto potranno essere utili per valutare se tale sistema di allestimento del campione potrà essere vantaggioso, se inserito nella routine diagnostica, per ottimizzare le prestazioni del laboratorio in termini di riduzioni dei costi analitici e della tempistica di risposta. Va inoltre rimarcato che, sempre dall'analisi dei dati ottenuti, la placenta della madre, ai fini della diagnosi di aborto per Neosporosi, rappresenta un campione particolarmente significativo, in quanto, nella nostra casistica, essa è risultata positiva in 10 casi su 11 (90,9%) pervenuti da animali che possono essere considerati positivi alla diagnosi molecolare.

Da questi dati trova ragione la sensibilizzazione dei veterinari affinchè sia prelevata anche la placenta per garantire i migliori risultati quando si affronta la diagnosi delle patologie abortigene nel bovino.
Considerando infine l'incidenza dell'aborto e i suoi riflessi sanitari nella gestione del patrimonio zootecnico in allevamento, la diagnosi molecolare di *Neospora caninum* diventa importante per definire la prevalenza della Neosporosi tra le cause di aborto, oltrechè per completare l'offerta di servizio diagnostico reso all'utenza nella determinazione delle cause di aborto nei bovini.

Bibliografia

1. Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, et al.. 1997 Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infectionin dairy cattle. J Am Vet Med Assoc, 210, 1169-1172
2. De Marez T, Liddell S, Dubey JP, et al. 1999 Oral infection of calves with *Neosporacaninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int J Parasitol 29, 1647-1657
3. Dubey JP, Lindsay DS. 1996 A review of *Neospora caninum and neosporosis. Vet Parasitol, 67, 1-59*
4. Gondim LF, Gao L, McAllister MM. 2002 Improved production of *Neospora caninum oocysts, cyclical oral* transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. J Parasitol 88, 1159 63
5. Hernandez J, Risco C, Donovan A. 2001 Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows J Am Vet Med Assoc 219, 632-635.
6. Monnier M., Lacerenza D., Benedetto A., Lai J., Tramuta C., Nebbia P., Rosati S., Zoppi S., Dondo A. Diagnostica molecolare di *Neospra caninum* nei bovini: validazione di una metodica in simplex PC. Atti del X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Alghero (SS) 22-24 Ottobre 2008
7. Muller N., Zimmermann V., Hentrich B., Gottstein B. 1996 Diagnosis of *Neospra canium* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. J of Clinical Microbiology, 34 (11) 2850-2852

VALIDAZIONE DI UN METODO ELISA PER LA RICERCA DI ENTEROTOSSINA DIARROICA PRODOTTA DA *BACILLUS CEREUS*

[1]Ghia C.A., [1]Gallina S., [1]Buonincontro G., [1]Bianchi D.M., [1]Gemmato A., [1]Liuni F.F., [1]Adriano D., [1]Decastelli L.
S.C.Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Key words: Enterotoxin, *Bacillus cereus*, **validation**

SUMMARY
Some strains of *Bacillus* spp. produce enterotoxin that cause food poisoning. This toxin can be detcted using commercial immunoassay kits easy to use and quick to produce results.
The aim of this work was to validate a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin in food and *Bacillus* spp. Cultures (The *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin -BDE- visual immunoassay -VIA- ELISA kit, Tecra Diagnostics, Chatswood, NSW, Australia)
The assay was validated from a total of 42 food sample (21 artificially contaminated by *Bacillus cereus* ATCC 10876) and 40 bacterial strains (*B.cereus* ATCC 10876, enterotoxin diarrhoeal producer, and *B.subtilis* ATCC 6633). The validation consist of the determination of analytical sensitivity, accuracy, analytical specificity and robustness.
The robustness includes different analytical sessions, that is frozen and pH stability of samples, different condition of incubation of first step ELISA (low temperature and humidity) and extension of time reading of plate ELISA. We conclude that the Tecra ELISA kit described here is sufficiently sensitive, accurate, precise, and reproducible for enterotoxin diarrhoeal detection in foods.

INTRODUZIONE
Le tossinfezioni alimentari causate da *Bacillus cereus* sono notoriamente classificate come sindrome emetica e sindrome diarroica. In Asia la sindrome emetica è quella più largamente diffusa, mentre in Europa e in Nord America è più frequente la sindrome diarroica (5). La sintomatologia della sindrome emetica compare dopo 1-6 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato ed è causata da un'enterotossina (cereulide) termostabile e resistente a valori estremi di pH (2-11) (1).
La presenza di questa enterotossina può essere evidenziata mediante l'uso di colture cellulari (Hep-2), cromatografia liquida e metodi molecolari (PCR) (2, 4).
La sindrome diarroica compare dopo 6-15 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato da enterotossina diarroica, termolabile, prodotta dalle forme vegetative di *B. cereus* nel piccolo intestino dell'ospite (dose infettante 10^6 UFC/g) (3). La sintomatologia è in genere autolimitante.
La presenza dell'enterotossina diarroica prodotta da *Bacillus cereus* può essere rilevata con kit commerciali (ELISA, RPLA). Tuttavia, le analisi condotte con il metodo RPLA, peraltro di lunga esecuzione (circa 24 ore), devono essere ulteriormente confermate con metodi biologici (6).
Per tale ragione l'ELISA, che rileva oltre alla tossine prodotte da *B. cereus* anche quelle prodotte da *B. thuringeneis*, per l'elevata sensibilità e la rapidità di esecuzione, rappresenta un metodo più efficace per la rilevazione di tali enterotossine. Il kit necessita, qualora venissero analizzati campioni prelevati nell'ambito del controllo ufficiale e per attivare allerte, ritiri e richiami di prodotto, è necessario effettuare prove di conferma, secondo quanto previsto dal metodo FDA (8).
Il presente lavoro descrive la validazione del kit ELISA Tecra per la determinazione dell'enterotossina diarroica in diverse matrici alimentari e colture di *Bacillus cereus.*

MATERIALI E METODI
Il processo di validazione è stato eseguito secondo la norma UNI CEI EN ISO IEC 17025:2005 "Requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e taratura" e le Linee Guida II.ZZ.SS. (7).
Sono state processate 40 colture batteriche (20 di *B.cereus* ATCC 10876, produttore di enterossina diarroica, e 20 di *B.subtilis* ATCC 6633) e 42 di alimenti (Grafico 1) di cui 21 contaminati artificialmente con *B. cereus* (ATCC 10876). La preparazione dei campioni, l'allestimento dell'ELISA e l'interpretazione dei risultati sono stati effettuati secondo le istruzioni della ditta produttrice.

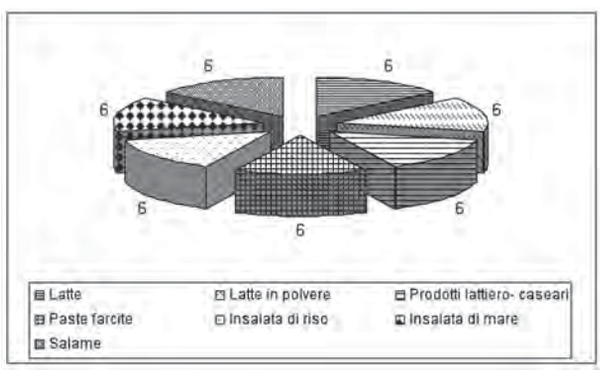


Grafico 1: Tipologie di alimenti esaminati

Sono stati considerati positivi I campioni con densità ottica > 0,2 e negativi quelli con densità ottica inferiore a tale valore.
Sono stati valutati i seguenti indici di prestazione:

1. Specificità analitica: 41 campioni certamente negativi sono stati analizzati col metodo in esame (20 colture di *B.subtilis* ATCC 6633 e 21 campioni alimentari).
2. Sensibiltà analitica: è stata determinata processando 20 brodocolture di *B.cereus* ATCC 10876, produttore di enterossina diarroica, e 21 campioni della routine, preventivamente analizzati per definirne la negatività e successivamente contaminati con *B. cereus* (ATCC 10876).
3. Robustezza: è stata valutata su due campioni di insalata di riso di cui uno contaminato con *B. cereus* (ATCC 10876), con 6 prove indipendenti, in due sedute analitiche. La robustezza è stata valutata attraverso l'introduzione di piccole variazioni nella modalità di escuzione dell'ELISA rispetto a quanto disposto dal kit. Tali variazioni erano legate alle modalità di conservazione del campione (fresco/congelato), alla preparazione dello stesso portandolo a valori di pH pari a 2, a differenti condizioni di incubazione del campione nella prima fase dell'ELISA, ovvero di temperatura e di umidità (30°C anzichè 37°C e incubazione in camera umida e senza) ed infine aumento del tempo di reazione tra substrato-cromogeno ed il complesso antigene-anticorpo formatosi (durata della terza incubazione).

4. Precisione: intesa come riproducibilità intermedia. Le 7 matrici di alimento testate (graf. 1) sono state analizzate in triplicato come campioni negativi e, le stesse, sono state contaminate per ottenere i campioni positivi. In totale sono state eseguite 42 prove dallo stesso operatore nella stessa seduta analitica con lo stesso kit e lo stesso lettore spettrofotometrico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Riguardo la specificità analitica, i risultati mostrano una specificità del 100% e pertanto non si evidenziano interferenze legate alle caratteristiche intrinseche delle diverse matrici esaminate. I risultati ottenuti evidenziano inoltre una sensibilità analitica ed una riproducibilità intermedia del 100% (Tabella 1).

Tabella 1: Sensibilità e Specificità del test ELISA

		Risultati Kit ELISA Tecra		
		+	-	Totale
Risultati attesi	+	41	0	41
	-	0	41	41
		41	41	82

Il metodo è risultato robusto, fatta eccezione per valori di pH <3 che inficiano il metodo, come peraltro indicato nelle istruzioni della ditta produttrice. Per quanto riguarda le altre variabili esaminate nessuna di queste influenza in modo significativo i risultati attesi.

Lo studio ha permesso di valutare la praticità d'uso del kit ELISA, la facilità di allestimento ed esecuzione e la lettura standardizzata che ne consentono l'utilizzo da parte di personale addestrato per l'esecuzione dei comuni test immunoenzimatici. I risultati possono essere ottenuti in 4-5 ore dall'inizio dell'analisi, consentendo quindi una risposta in tempi rapidi per identificare o escludere nella tossina del *B. cereus* la causa della tossinfezione.

I risultati della validazione indicano che, utilizzando una adeguata preparazione del campione, con il kit si ottiene una soddisfacente rilevazione della presenza dell'enterotossina in varie tipologie di alimenti e brodocolture di *Bacillus* spp provenienti da casi di MTA.

BIBLIOGRAFIA

1. Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M. (1995) "A novel dedecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*." *FEMS Microbiology Letters.* 129: 17-19.
2. Ehling-Schulz M., Vukov V., Schulz A., Shaheen R., Andersson M., Märtlbauer E., Scherer S. (2005) "Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus. Applied and Evironmental Microbiology*. 71: 113-115.
3. Granum P. E., Lund T. (1997) "*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins". *FEMS Microbiology Letters.* 157: 223-228.
4. Jääskeläinen E. L., Haggblom M. M., Andersson M. A., Vanne L., salkinoja-Salonen M. S. (2003) "Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: quantitative analysis by chemical and biological methods". *Journal of Food Protection* 66: 1047-1054.
5. McKillip J. L. (2000) "Prevalence and expression of enterotxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review". *Antonie van Leeuwenhoek. Kluwer Academic Publisher.* 77: 393-399.
6. Patel P. (1994) *Rapid analysis techniques in food microbiology"* BPOD Editor. 94-95.
7. Linee Guida IIZZSS: validazione intralaboratorio di metodi di prova immunochimici di screening in accordo con la Decisione 2002/657/CE (2004).
8. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073688.htm

DIVERSITA' GENETICA DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE DEL BOVINO IN ITALIA

Giammarioli M.[1], Canelli E.[2], Ciulli S.[3], Pellegrini C.[1], Rossi E.[1], De Mia G.M.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia;
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia;
[3]Università di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Ozzano Emilia (BO);

Keywords: BVDV, pestivirus, genotipizzazione

SUMMARY
The genetic heterogeneity of 111 Italian BVDV isolates was investigated by phylogenetic analysis of partial 5'-UTR and for selected viruses, of the genomic region encoding autoprotease Npro. Additional sequences of other Italian BVDV isolates were acquired from the GenBank database. At the subgroup level, pair wise similarity and cluster analysis provided a clear-cut assignation to 10 distinct genotypes of 106 isolates typed as BVDV-1 namely respectively BVDV-1a (n=12), BVDV-1b (n=47), BVDV-1d (n=4), BVDV-1e (n=26), BVDV-1f (n=5), BVDV-1g (n=4), BVDV-1h (n=7), BVDV-1j (n=1), BVDV-1k (n=2) and BVDV-1l (n=1). Five isolates were typed as BVDV-2. The results provided evidence of a high BVDV genetic heterogeneity in Italy as a result of the absence of any BVDV systematic control measures.

INTRODUZIONE
Il virus della Diarrea virale del bovino (BVDV) appartiene al genere *Pestivirus*, assieme al virus della Peste suina classica e della Border disease, all'interno della famiglia *Flaviviridae*. Allo stato attuale ne sono state approvate due specie, il BVDV di tipo 1 (BVDV-1) e il BVDV di tipo 2 (BVDV-2). Il BVDV-1, più diffuso in Europa, è responsabile, per lo più, di infezioni a carico del tratto respiratorio e/o digerente. Il BVDV-2, più diffuso in nord America, può causare patologie simili al BVDV-1, ma può anche essere responsabile di forme emorragiche particolarmente gravi. La caratterizzazione genetica di questo virus si avvale delle tecniche di analisi di sequenza a carico delle regioni del genoma 5'-UTR, Npro ed E2 in base alle quali il BVDV-1 può essere suddiviso in almeno 15 gruppi genetici (6, 8, 10), mentre il BVDV-2 comprende invece 2 soli gruppi (4). In Italia, studi condotti sulla prevalenza del BVDV hanno evidenziato la circolazione di almeno 9 gruppi genetici per BVDV-1 (2, 3, 5) ed anche la presenza del BVDV-2 è stata documentata (7). Al fine di definire il pattern genetico relativo alla diffusione del BVDV in Italia, è stato analizzato un elevato numero di isolati basando l'indagine sull'analisi della regione 5'-UTR combinata, per alcuni stipiti virali opportunamente selezionati, con l'analisi della regione Npro.

MATERIALI E METODI
Virus - Sono stati impiegati 111 isolati BVDV collezionati nell'arco temporale 1995-2009 da 12 regioni italiane. Ulteriori sequenze, ritenute significative, sono state ottenute dal database GenBank. La maggior parte degli stipiti era di origine bovina (n=106) per lo più provenienti dalle regioni del nord, in minima parte provenivano da ovini (n=4) e bufalini (n=4). Lo studio filogenetico è stata effettuato attraverso analisi di sequenza della regione parziale 5'-UTR e per alcuni stipiti, selezionati sulla base del loro valore di bootstrapping, della regione Npro.

Caratterizzazione genetica - L'RNA totale è stato estratto mediante TRIzol. La sintesi del cDNA è stata effettuata utilizzando dei random primers. La regione 5'-UTR è stata amplificata utilizzando la coppia di primers 324/326 che amplifica un frammento di 288 bp (9). Per la amplificazione del gene Npro è stata usata una nested PCR condotta utilizzando i primers esterni OI 100 and OL 1400R (1) e i primers interni BD1 e BD3 (10) che amplificano un frammento di 390 bp. Gli amplificati sono stati purificati e sequenziati mediante il kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing, basato sull'incorporazione di dideossinucleotidi marcati, utilizzando il sequenziatore ABI Prism 310. Le sequenze nucleotidiche, allestite da tre diversi amplificati, sono state allineate mediante il software Clustal X (versione 1.83) con sequenze di stipiti di riferimento presenti in GeneBank. L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando l'algoritmo di neighbour-joining con il pacchetto MEGA (versione 3.1) program.

RISULTATI
Cinque isolati sono stati caratterizzati come BVDV-2. Tutti gli altri, appartenenti al tipo BVDV-1, clusterizzano in 10 gruppi genetici distinti, in base all'analisi di sequenza in 5'-UTR e, più precisamente, BVDV-1a (n=12), BVDV-1b (n=47), BVDV-1d (n=4), BVDV-1e (n=26), BVDV-1f (n=5), BVDV-1g (n=4), BVDV-1h (n=7), BVDV-1j (n=1), BVDV-1k (n=2) e BVDV-1l (n=1). L'analisi di sequenza eseguita a carico della regione Npro, ha confermato gli stessi raggruppamenti con simili valori di bootstrapping. Gli isolati di origine non bovina sono tutti appartenenti al tipo BVDV-1. Se si eccettua il subgruppo BVDV-1b che appare chiaramente prevalente nel nord-est, per gli altri non sembrano esserci correlazioni di tipo geografico.

DISCUSSIONE
Scopo del presente lavoro è stato quello di definire la diversità genetica del virus BVDV in Italia analizzando un elevato e geograficamente rappresentativo numero di campioni. Sulla base dei risultati ottenuti, si conferma la grande eterogeneità genetica del BVDV in Italia con la accertata circolazione di almeno 10 gruppi genetici distinti tra i quali il gruppo BVDV-1l, mai descritto in precedenza nel nostro Paese. La maggior parte degli allevamenti risulta infetta con virus del gruppo BVDV-1b e BVDV-1e, in linea con quanto evidenziato in numerosi altri Paesi europei. La presenza di virus riconducibili agli altri gruppi viene solo segnalata in maniera sporadica. Appena 5 isolati appartengono al tipo BVDV-2. Considerando quanto poco venga fatto per limitare la diffusione del BVDV nei nostri allevamenti, la presenza del BVDV-2 è, al contrario, molto rara. Ciò sarebbe a favore dell'ipotesi di una trasmissione per via iatrogena, ad esempio attraverso l'impiego di vaccini contaminati, più che lasciar pensare ad una vera e propria circolazione virale. In conclusione, i risultati del presente lavoro testimoniano un'alta diversità genetica del BVDV nel nostro Paese. Ciò è da ascrivere all'assenza di misure di controllo e/o eradicazione dell'infezione da BVDV su vasta scala. A tale riguardo, in Italia esistono attualmente solo iniziative a livello locale, non sempre su base obbligatoria. In tale contesto il commercio e la movimentazione degli animali espongono gli allevamenti ad un elevato rischio di introduzione del BVDV come pure alla evenienza di nuove varianti.

BIBLIOGRAFIA

1. Becher P, Orlich M, Shanon AD, Horner G, König M, Thiel HJ, 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol 78, 1357–1366*.

2. Canelli E., Luppi A., Fallacara F., Sozzi E., Lelli D., Martin Moreno A.M., Cordioli P. 2008. Genetic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Northern Italy during the 1999-2007 period. *7th ESVV Pestivirus Symposium, Uppsala (Sweden) 16-19 Sept. 2008, p. 179*

3. Ciulli S., Galletti E., Battilani M., Scagliarini A., Gentile A., Morganti L., Prosperi S., 2008. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: evidence of an increasing number of variants in Italy. *New Microbiologica, 31, 263-271*

4. Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, Vogel F., Gil L., 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res 87, 51–60*

5. Giammarioli M. Pellegrini C., Casciari C., Rossi E., De Mia G.M., 2008. Genetic diversity of *bovine viral diarrhea virus 1*: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. *J Vet Diagn Invest*, *20 (6), 783-788*

6. Jackova A., Novackova M., Pelletier C:, Audeval C:, Gueneau E., Haffar A., Petit E., Rehby L., Vilcek S., 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Vet Res Commun 32, 7-11*

7. Luzzago C, Bandi C, Bronzo V, Ruffo G., Zecconi A., 2001. Distribution pattern of bovine viral diarrhea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Vet Microbiol 83, 265–274*

8. Nagai M., Hayashi M., Itou M., Fukutomi T., Akashi H., Kida H., Sakoda Y., 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes*, *36 (1), 135-139*

9. Vilček Š, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ, 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol 136, 309–323*

10. Vilček Š, Paton DJ, Ďurkovič B, Strojni L, Ibata G, Moussa A Loitsch A, Rossmanith W, Vega S, Scicluna MT, Palfi V, 2001, Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol 146, 99–115*

RILIEVI BATTERIOLOGICI IN SILURI (*Silurus glanis*) PESCATI NELL'ALTO BACINO DEL FIUME PO

Giorgi I.[1], Fioravanti M.L.[2], Minardi D.[1], Guarise S.[3], Forneris G.[3], Florio D.[2], Arsieni P.[1], Scanzio T.[4], Pascale M.[5], Prearo M.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; [2] Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Tolara di sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO); [3] Facoltà di Medicina Veterinaria, Via L. da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO); [4]Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Corso di Studio in Scienze Naturali, Via P. Giuria, 15- 10126 Torino; [5] Ittiologo, Via Martiri della Libertà, 11 – 10060 Osasco (TO).

Key words: *Silurus glanis*, *Aeromonas hydrophila*, Bacino del fiume Po.

INTRODUZIONE

I pesci appartenenti all'ordine Siluriformes sono suddivisi in circa 30 famiglie; vivono quasi tutti in acqua dolce e hanno una distribuzione ormai cosmopolita.

Il genere *Silurus* appartiene alla famiglia Siluridae, rappresentata in Europa da 2 specie, il siluro europeo (*Silurus glanis*) e il siluro di Aristotele (*Silurus aristotelis*), diffuso in Grecia e nella regione del Mar Ionio.

Negli anni 50'-60' è stato immesso in laghetti e in canali di bonifica per la pesca sportiva ed ha potuto facilmente diffondersi nelle acque libere, a danno delle specie ittiche autoctone aventi la stessa nicchia ecologica.

In Italia la prima segnalazione risale al 1954 nel fiume Adda (4). mentre la sua acclimatazione è stata osservata con certezza alla fine degli anni '70 (3). Attualmente la specie è diffusa in tutta l'area padana e in particolare nel fiume Po e affluenti maggiori.

L'habitat è costituito dal tratto inferiore dei fiumi e dai canali, fossi e scoli della pianura (zona a ciprinidi limnofili), nonché dagli stagni, laghi e paludi; predilige le zone profonde con fondale fangoso e/o sabbioso, possibilmente se ricche di vegetazione acquatica.

Il siluro è un pesce fotofobo, il suo picco di massima attività coincide con le ore crepuscolari e notturne, durante le quali nuota sul fondo ricercando il cibo con i barbigli tattili. Si può osservare anche durante il giorno, specialmente in condizioni di tempo coperto e di torbidità delle acque.

L'attività notturna del siluro è molto radicata: se viene costretto ad alimentarsi di giorno, si riduce la quantità di cibo assunta e dopo che è stato portato ad alimentarsi di giorno ritorna alla sua normale attività notturna se gli viene lasciato libero accesso al cibo (2). L'attività alimentare è massima durante i mesi caldi, mentre invece cessa del tutto in inverno, quando l'animale cade in una specie di letargo.

La dieta del siluro è molto varia, comprende elementi vegetali, animali e detriti organici. Nell'alimentazione dei giovani prevalgono gli invertebrati, alghe e macrofite acquatiche. Negli adulti la componente vegetale scompare al crescere della taglia: si nutrono prevalentemente di pesci, ma anche crostacei decapodi, anellidi e larve d'insetti. Gli esemplari di maggiori dimensioni si nutrono di rane, ratti e uccelli selvatici.

Il siluro raggiunge la maturità sessuale dai tre ai cinque anni d'età, a seconda della disponibilità di cibo dell'ambiente in cui vive. Il periodo riproduttivo va dalla tarda primavera all'estate, quando la temperatura dell'acqua raggiunge circa i 20°C.

I giovani tendono a vivere in branchi, mentre diventano territoriali e solitari con l'aumentare della taglia.

La specie è molto prolifica, la femmina emette diverse migliaia di uova per ogni chilo di peso. Il maschio sorveglia le uova fino alla schiusa che, ad una temperatura dell'acqua superiore ai 20-24°C, avviene di solito dopo tre o quattro giorni. Dopo il riassorbimento del sacco vitellino, gli avannotti si cibano di microrganismi planctonici.

Negli ecosistemi acquatici dell'Italia settentrionale il siluro mostra accrescimenti più rapidi rispetto a quelli osservati nei paesi d'origine; una comparazione tra le curve di accrescimento relative a vari corsi d'acqua europei mette in evidenza che nel fiume Po la specie mostra di gran lunga la migliore capacità di crescita, probabilmente grazie ad un regime termico ottimale e all'assenza di validi competitori e predatori (5).

Lo scopo di questa indagine è stato quello di determinare la presenza di batteri in siluri asintomatici pescati in un tratto del fiume Po, onde valutare il ruolo di tale predatore nella possibile diffusione di alcune patologie ittiche di natura batterica.

MATERIALI E METODI

Da febbraio 2007 a febbraio 2009 sono stati esaminati nel Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, 105 esemplari di siluro, provenienti dal fiume Tanaro (provincia di Alessandria) e dal fiume Po (provincia di Alessandria e Parma). Essi sono stati pescati per mezzo di elettrostorditore e sono pervenuti freschi in laboratorio. Il peso medio dei soggetti esaminati è stato di 4,5 Kg, con una lunghezza media di circa 80 cm. Il soggetto di maggiori dimensioni misurava 150 cm di lunghezza e pesava più di 22 kg.

L' esame batteriologico è stato effettuato mediante semina diretta da rene su Agar sangue e incubazione a 22°C per un massimo di 72 ore; trascorso tale periodo l'esame veniva considerato negativo.

In caso di crescita batterica, le colonie sono state prelevate con un ansa sterile e trapiantate su terreni selettivi. Successivamente è stata effettuata la colorazione di Gram e il test dell'ossidasi. L'identificazione biochimica è stata effettuata tramite le gallerie API (API 20E; API 20NE; BioMérieux).

RISULTATI

Sui 105 campioni analizzati sono stati riscontrati 33 casi di positività all'esame batteriologico (31,4%).

Il germe più frequentemente isolato è stato *Aeromonas hydrophila* (21 casi pari al 63,6% degli isolati). Nei restanti 12 casi sono stati isolati: *A. sobria*, *Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens e Plesiomonas shigelloides*. I risultati sono riassunti in tabella 1.

Tutti questi batteri possono essere considerati dei germi ambientali, che causano patologia solamente in determinate condizioni ambientali e di stress.

Tutti i soggetti da cui si è potuto isolare una specie batterica, non presentavano sintomatologia evidente o lesioni agli organi interni.

Tabella 1 – Specie batteriche e numerosità di isolamento.

N° Isolati	Specie batterica
21	*Aeromonas hydrophila*
3	*Aeromonas sobria*
6	*Plesiomonas shigelloides*
1	*Pseudomonas fluorescens*
2	*Pseudomonas aeruginosa*

DISCUSSIONE

In base ai dati ottenuti da questo studio preliminare, si può osservare che circa il 30% dei pesci pescati ha presentato una positività all'esame colturale, sebbene non fossero presenti segni di malattia. Probabilmente la modalità di pesca utilizzata (elettrostordimento), ha giocato un ruolo particolare nella diffusione di tali specie batteriche nel sistema circolatorio, vista la natura dei germi isolati, da considerarsi come dei tipici opportunisti ambientali,

La presenza del siluro nei nostri fiumi rappresenta una minaccia per le popolazioni indigene di pesci e rischia di alterare gli equilibri ambientali, determinando una riduzione del numero delle specie e degli individui (6).

Il siluro potrebbe andare progressivamente affermandosi a discapito delle specie autoctone: tale specie ittica ha il vantaggio della ragguardevole taglia, dell'estrema versatilità e all'abitudine di cacciare di notte, durante la quale gli altri pesci sono più vulnerabili e gli altri possibili predatori, di norma, non sono attivi.

In questi anni si è assistito in molti casi ad un peggioramento della qualità dell'acqua (inquinamenti, rettificazioni, riduzioni di portata, costruzioni di sbarramenti, ecc.) e quindi conseguentemente ad una alterazione delle comunità ittiche, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. La presenza negli ambienti acquatici di una specie di così elevato sviluppo e di simili abitudini predatorie costituisce un'ulteriore fonte di impatto sulle comunità ittiche (1).

Un altro aspetto da considerare per l'impatto ambientale del siluro, è anche il ruolo epidemiologico che potrebbe svolgere come vettore di batteri e infezioni nell'ambiente fluviale.

E' importante proseguire tali indagini in modo da monitorare la presenza di patologie batteriche in questi predatori e verificare il reale ruolo patogeno che tali batteri possono svolgere nell'ecosistema fluviale.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il personale tecnico della provincia di Alessandria che ha contribuito alla raccolta dei campioni nel periodo in esame.

BIBLIOGRAFIA

1. Balma G.A.C., Del Mastro G.B. & Forneris G. (1989). Segnalazione di alcune specie ittiche esotiche d'importazione in Italia settentrionale con particolare riferimento alle acque piemontesi (Pisces, Osteichthyes). *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Stor. Nat. Milano*, 130, 7: 109-116.
2. Boujard T. (1995). Diel rhythms of feeling activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiol. & Behaviour*, 58, 4: 641-645.
3. Gandolfi G. & Giannini M. (1979). La presenza del *Silurus glanis* nel fiume Po (Osteichthyes, Siluridae). *Natura. Soc. Ital. Sci. Nat. Mus. Civ. Stor. Nat. Acquario Civ. Milano*, 70: 3-6.
4. Manfredi P. (1957). Cattura di un *Siluri glanis* nell'Adda presso Lecco. *Natura*, Milano, 48: 28-30.
5. Rossi R., Trisolini R., Rizzo M.G., Dezfuli B.S., Franzoi P. & Grandi G. (1992). Biologia ed ecologia di una specie alloctona, il siluro (*Silurus glanis*) (Osteichthyes, Siluridae) nella parte terminale del fiume Po. *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Museo Civ. Stor. Nat. Milano*, 132, 7: 69-87.
6. Zerunian S. (2002). Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia. *Edagricole, Bologna:* 220 pp.

SUMMARY

Silurus glanis or European catfish belongs to the family Siluridae. It eat mainly fish but also crustaceans, anellidae and insect larvae. From February 2007 to February 2009 were examined 105 samples of European catfish from the river Po. Bacteriological examination was performed, the bacterium most frequently isolated was Aeromonas Hydrophila. The presence of European catfish in our rivers is a threat to the indigenous populations of fish and could alter the environmental balance, leading to a reduction in the number of species and individuals.

SENSIBILITA' AD ALCUNI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *MYCOBACTERIUM MARINUM* ISOLATI DA PESCI

Giorgi I.[1], Zanoni R.G.[2], Florio D.[2], Arsieni P.[1], Fioravanti M.L.[2], Pavoletti E.[1], Prearo M.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;
[2]Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO).

Key words: *Mycobacterium marinum*, suscettibilità agli antibiotici, zoonosi.

INTRODUZIONE

Con il termine di Micobatteriosi o Tubercolosi ittica viene indicato un complesso di malattie sistemiche ad andamento cronico, sostenute da batteri acido-alcool resistenti (BAAR) appartenenti al genere *Mycobacterium*. Essi colpiscono numerose specie ittiche d'acqua dolce e salata, sia di allevamento che delle acque libere; sono germi ubiquitari, diffusi nel suolo, nei pascoli, in paludi ed in ambiente acquatico.
I micobatteri sono germi molto resistenti agli agenti fisici e sono in grado di permanere e sopravvivere molti mesi nell'ambiente.
Le Micobatteriosi atipiche sono state segnalate soprattutto in pesci d'acquario tropicali, ma anche in pesci allevati da consumo; non si conoscono specie refrattarie a questa infezione, naturale o sperimentale (5).
Tali microrganismi devono essere considerati agenti zoonotici, poiché possono penetrare attraverso ferite e abrasioni cutanee provocando la formazione di granulomi a carico della cute; non sono da escludere forme linfonodali, polmonari ed ossee, ad andamento molto più drammatico, soprattutto nei soggetti giovani, anziani o in quelli immunocompromessi.
Il periodo di incubazione nell'uomo di solito è intorno alle 3 settimane, ma in alcuni casi può superare i 9 mesi (7).
Le varie lesioni cutanee comprendono ascessi dermici ed ipodermici, fistole, granulomi suppurativi e noduli con aspetto multicentrico o sporotricoide, localizzati a gambe, braccia, mani e viso (6).
La terapia è lunga e difficile nell'uomo, e, al momento, impraticabile nei pesci. In questi episodi assume, quindi, fondamentale importanza l'isolamento e la tipizzazione del micobatterio coinvolto, necessaria per ottenere un esito corretto e soprattutto con il giusto significato diagnostico.
Mycobacterium marinum rappresenta indubbiamente, tra i micobatteri atipici, una della specie maggiormente isolata da pesci e uno dei più importanti agenti di micobatteriosi cutanea nell'uomo (5)
M. marinum è stato isolato per la prima volta da un pesce marino all'acquario di Philadelphia (2). Fu inizialmente ritenuto patogeno esclusivo delle specie marine (da cui il nome), mentre adesso, in accordo con i successivi isolamenti, viene considerato una specie ubiquitaria (5).
Gli antibiotici che hanno dimostrato essere attivi in vitro contro *M. marinum* sono: azithromyin, claritromicina e alcuni chinoloni, etambutolo, rifampicina, streptomicina, tetracicline, trimethoprim-sulfametazolo (1; 3). Alcuni autori non ritengono che la streptomicina sia attiva contro *M. marinum* (10), mentre altri hanno riscontrato numerosi ceppi di *M. marinum* poco o per niente inibiti rispettivamente da rifampicina e ciprofloxacina (4).
Per quanto riguarda la terapia in vivo, le lesioni superficiali possono essere trattate con la somministrazione da 3 a 6 mesi di rifampicina e claritromicina; laddove sia presente infezione disseminata, sono necessari ulteriori 3-4 mesi di terapia, con aggiunta di doxiciclina e/o etambutolo (9).
Scopo del presente lavoro è quello di valutare la sensibilità *in vitro* di alcuni ceppi di *M. marinum* isolati da materiale ittico, nei confronti di alcuni antibiotici utilizzati per la terapia dei micobatteri.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra gennaio 2007 e marzo 2009 sono stati isolati e tipizzati 10 ceppi di *M. marinum* e stoccati tramite cryobank in congelatore a -80°C; successivamente sono stati nuovamente seminati per testare la loro sensibilità agli antibiotici.
I ceppi isolati provenivano 5 da pesci ornamentali dulciacquicoli (2 da *Poecilia latipinna*, 2 da *Carassius auratus* e 1 da *Petitella georgia*), 4 da pesci d'allevamento (4 ceppi da persico-spigola, soggetti ibridi *Morone chrysops* x *M. saxatilis*) e 1 da un pesce marino non allevato (1 da grongo, *Conger conger*).
La caratterizzazione fenotipica era stata eseguita valutando la morfologia, la temperatura e la velocità di crescita, la capacità di produrre pigmento e la fotoinduzione. La caratterizzazione biochimica era stata eseguita, seguendo le modalità indicate dal CDC Manual (8).
Sono state prelevate 2 sferette dai cryobank contenenti i ceppi da testare e sono state poste in una provetta contenete 3 ml di Middlebrook Broth 7H9 (Microbiol) e incubate a 28°C per 7 giorni. Dopo aver verificato visivamente un intorbidamento del brodo, sono stati prelevati 0,2 ml dello stesso da ciascuna provetta e seminati su tubi di Löwenstein-Jensen, nuovamente incubati a 28°C per 7 giorni. Una volta avvenuta la crescita, le colonie sono state prelevate con un tampone sterile e stemperate in provette contenenti 2 ml di soluzione fisiologica sterile, fino al raggiungimento di una torbidità pari a 0,5 della scala di McFarland. Da ciascuna provetta sono stati prelevati 0,2 ml e seminati su 5 tubi Löwenstein-Jensen, (Microbiol), di cui 4 antibiotati e uno semplice, da utilizzare come controllo di crescita. Gli antibiotici presenti nei terreni, e la rispettiva concentrazione, sono: etambutolo (2 µg/ml), streptomicina (2 µg/ml), isoniazide (0,2 µg/ml) e rifampicina (40 µg/ml).
Il micobatterio veniva ritenuto resistente all'antibiotico in esame se, all'osservazione diretta, non si riscontrava una differenza nella quantità di colonie cresciute sul terreno antibiotato e sul terreno di controllo.
Se, al contrario, non vi era crescita sul terreno antibiotato, il micobatterio veniva considerato sensibile all'antibiotico in esame.
Il micobatterio veniva valutato come inibito dall'antibiotico in esame se la crescita sul terreno antibiotato si mostrava visivamente pari alla metà o meno di quella presente sul terreno di controllo.

RISULTATI

Tutti i ceppi testati sono risultati sensibili all'etambutolo, mentre per la rifampicina sono risultati sensibili solo 6; gli altri 4 ceppi presentavano solo un'inibizione della crescita causata dall'antibiotico.
Il 90% dei ceppi è risultato resistente all'isoniazide, con l'eccezione di un unico ceppo inibito dall'antibiotico, mentre 8 ceppi su 10 sono risultati resistenti alla streptomicina.
Nella tabella 1 vengono indicati i risultati per ceppo, mentre nella tabella 2 vengono riassunti i dati con le percentuali relative.

Tabella 1 – Risultati della sensibilità agli antibiotici utilizzati dei ceppi di *Mycobacterium marinum* testati.

	Rifampicina	Streptomi-cina	Isoniazide	Etambutolo
1	I	I	R	**S**
2	**S**	R	R	**S**
3	**S**	R	R	**S**
4	I	I	R	**S**
5	**S**	R	R	**S**
6	**S**	R	R	**S**
7	I	R	I	**S**
8	**S**	R	R	**S**
9	**S**	R	R	**S**
10	I	R	R	**S**

Legenda – S = Sensibile; I = Inibito; R = Resistente

Tabella 2 – Riepilogo dei risultati di sensibilità agli antibiotici utilizzati.

	Sensibili	Inibiti	Resistenti
Rifampicina	6	4	0
Streptomicina	0	2	8
Isoniazide	0	1	9
Etambutolo	10	0	0

DISCUSSIONE

In base ai risultati di questo studio preliminare, l'antibiotico più efficace *in vitro* tra i 4 presi in esame contro *M. marinum*, è l'etambutolo, come ampiamente riportato in letteratura (1; 3; 9).

La rifampicina ha anch'essa inibito totalmente (6 ceppi) o parzialmente (4 ceppi) la crescita dei micobatteri testati: anche in questo caso, tale disomogeneità nella sensibilità all'antibiotico da parte di *M. marinum* è già stato riportato in altri lavori (4).

La streptomicina e l'isoniazide si possono considerare, nel complesso, inefficaci nell'impedire la crescita di *M. marinum in vitro*; per l'isoniazide questo risultato trova completo riscontro in letteratura, mentre alcuni autori ritengono la streptomicina attiva contro *M. marinum* (1; 3), mentre nel nostro caso lo è stato solo parzialmente nel 20% dei casi. Tale risultato sembrerebbe avvalorare le tesi di autori che considerano la streptomicina poco attiva nei confronti di *M. marinum* (10).

Le micobatteriosi sono importanti zoonosi e devono essere considerate un rischio significativo per tutti coloro che lavorano o manipolano materiale ittico o possiedono un acquario. I principali metodi di controllo in questi casi sono l'igiene, le disinfezioni e l'eliminazione dei morti e/o degli infetti. Oltre a questi soggetti a rischio, si devono aggiungere tutti gli individui immunocompromessi, che sono spesso colpiti da patologie da germi opportunisti, tra I quali i micobatteri atipici.

In caso di micobatteriosi umana vengono usati numerosi protocolli terapeutici, in particolare associazioni di antibiotici, per aumentare le possibilità di successo della terapia, che risulta spesso lunga e difficile. Tali protocolli sono principalmente a base di tetracicline, ma ricorrono spesso anche ad etambutolo e rifampicina.

E' quindi di fondamentale importanza l'isolamento e la tipizzazione del micobatterio causa della patologia, attraverso un esame colturale delle lesioni, eventualmente supportato da esami istologici e di biologia molecolare. Una volta isolato il patogeno, potranno così essere condotte prove di sensibilità *in vitro*, per formulare una terapia antibiotica mirata e efficace.

Tale studio, da considerarsi preliminare, mette le basi per la conoscenza sulla sensibilità alle sostanze terapeutiche usate in umana contro i micobatteri, di isolati atipici provenienti da materiale ittico e potenzialmente pericolosi per l'uomo. Lo studio dovrà essere esteso ad altre specie di micobatteri atipici, aumentando la rosa delle sostanze terapeutiche da saggiare.

BIBLIOGRAFIA

1. Alloway J.A., Evangelisti S.M. & Sartin J.S. (1995). *Mycobacterium marinum* arthritis. *Seminars Arthritis Rheumatism*, 24: 382-390.
2. Aronson, J. D. (1926). Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *J. Infect. Dis.*, 39: 314-320.
3. Aubry A., Chosidow O., Caumes E., Robert J. & Cambau E. (2002). Sixty-three cases of *Mycobacterium marinum* infection-clinical features, treatment, and antibiotic susceptibility of causative isolates. *Arch. Int. Med.*, 162: 1746-1752.
4. Bhatty M.A., Turner D.P.J. & Chamberlain S.T. (2000). *Mycobacterium marinum* hand infection: case report and review of literature. *Br. J. Plast. Surg.*, 53: 161-165.
5. Decostere A., Hermans K. & Haesebrouck F. (2004). Piscine Mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it caused in fish and humans. *Vet. Microbiol.*, 99: 159-166.
6. Escalonilla P., Esteban J., Soriano M.L., Farina M.C., Piqu E., Grilli R., Ramirez J.R., Barat A., Martin L. & Requena L. (1998). Cutaneous manifestations of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Exp. Dermatol.*, 23, 5: 214-221.
7. Jernigan J.A. & Farr B.M. (2000). Incubation period and sources of exposure for cutaneous *Mycobacterium marinum* infection: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 31: 439-443.
8. Kent T.P. & Kubica P.G. (1985). Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratories. *U.S. Department of Human Services. Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.*
9. Nielsen C.T. & Andersen Á.B. (2009). Hypercalcemia and renal failure in a case disseminated *Mycobacterium marinum* infection. *Eur. J. Internal Med.*, 20: e29-e31.
10. Wallace R.J.Jr., Glassroth J., Griffith D.E., Olivier K.N., CookJ.L. & Gordin F. (1997). Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculosus mycobacteria. American Thoracic Society. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 156: S1-S25.

SUMMARY

The atypical Mycobacteriosis should be considered zoonotic agents, since they can penetrate through skin wounds and abrasions, causing the formation of granuloma in the skin. The purpose of this work is to evaluate the susceptibility to certain antibiotics of *Mycobacterium marinum*, one of the most important zoonoses agents among non tuberculous mycobacteria. All strains were susceptible to ethambutol while only 6 were sensitive to rifampicin. 90% of strains were resistant to isoniazid, while 8 strains out of 10 were resistant to streptomycin.

CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIE ENTERICA* SIEROTIPO NAPOLI: SIEROTIPO "RI-EMERGENTE" IN ITALIA

Graziani C.[1], **Busani L.**[1], **Dionisi A.M.**[2], **Caprioli A.**[1], **Luzzi I.**[2]

[1] *Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma;* [2] *Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Malattie infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Roma.*

Key words: *Salmonella* Napoli, geni di virulenza, elettroforesi in campo pulsato

SUMMARY

During the last decade, in the framework of Enter-net surveillance, an increase of cases of human infection due to *Salmonella enterica* serovar Napoli was observed in France, Italy and Switzerland. This serovar is rarely isolated from farm animals and food of animal origin, while most of the non human strains come from environmental sources, mainly surface water. In this study we have analysed a collection of *S*. Napoli strains isolated from different sources in Italy between 2000 and 2005 for the presence of virulence genes and the evaluation of their genetic relatedness.

INTRODUZIONE

Salmonella enterica rappresenta uno dei principali patogeni responsabili di tossinfezione alimentare. La trasmissione dei differenti sierotipi di *Salmonella* all'uomo avviene principalmente attraverso il consumo di alimenti d'origine animale e vegetale contaminati. Le infezioni umane sono principalmente associate a gastroenteriti, ma non meno importanti risultano essere le infezioni sistemiche. Oltre che alle caratteristiche dell'ospite, il tipo di manifestazione clinica sembra essere associato a caratteristiche batteriche, tra cui la presenza di geni virulenza (1) che possono essere veicolati da elementi genetici mobili. Importanti risultano essere le isole di patogenicità (PAIs o Salmonella pathogenicity islands-SPIs), capaci di trasportare più geni e di integrarsi nel cromosoma dell'ospite, escindersi, e trasferirsi ad un nuovo ospite attraverso batteriofagi coniugativi e plasmidi (2, 3). La presenza e l'acquisizione di geni di virulenza ed elementi genetici mobili sembra avere un ruolo nella patogenesi e nell'adattamento di *Salmonella* a nuovi serbatoi.

Durante l'ultimo decennio, il sistema di sorveglianza Enter-net, ha registrato un aumento dei casi umani causati da *Salmonella* Napoli in Italia, Francia e Svizzera (4). Questo sierotipo è raramente isolato da animali e alimenti d'origine animale, mentre è di frequente riscontro in campioni ambientali (4). Fino ad oggi, poco è noto su questo sierotipo e in letteratura sono presenti solo tre studi, in qualche modo tutti associati all'Italia (5, 6, 7). Tenendo conto dell'aumento degli isolamenti di *S*. Napoli è importante studiare le caratteristiche di questo sierotipo, al fine di ottenere informazioni sulle potenziali fonti di esposizione per l'uomo. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare una collezione di ceppi di *S*. Napoli isolati in Italia, tra il 2000 e il 2005, provenienti da diverse fonti, attraverso lo studio dei geni di virulenza e la valutazione della loro correlazione genetica.

MATERIALI E METODI

Ceppi di *S.* Napoli analizzati:

Sono stati analizzati 44 ceppi appartenenti ad una collezione presente presso l'Istituto Superiore di Sanità (Tabella 1).

Determinazione della sensibilità agli antibiotici:

Tutti i ceppi sono stati analizzati con il metodo di agar diffusione con dischetto in accordo alle linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Gli antibiotici testati sono quelli inclusi nel panel Enter-Net.

Ricerca dei geni di virulenza:

Tutti i ceppi selezionati sono stati sottoposti ad analisi molecolare per la ricerca dei geni di virulenza (Tabella 1) attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR). L'estrazione del DNA è stata effettuata attraverso trattamento a 100°C di colonie isolate. Le sequenze dei primers e le condizioni di amplificazione sono state reperite in letteratura (2,8,9,10).

Determinazione del pulsotipo mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE):

Le correlazioni genetiche tra i 44 ceppi è stata determinata attraverso l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) in accordo con il protocollo Pulse-Net Europe. I profili di PFGE sono stati analizzati con il Software BioNumerics.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati mostra che tutti i ceppi testati sono sensibili agli antibiotici. I geni di virulenza riscontrati con maggiore frequenza (Tabella 1) sono *ssaQ*, *sopB*, *mgtC* (presenti sulle SPIs) e *bcfC* (gene fimbriale). Al contrario, i geni *gipA, spvC, avrA* and *sodC1* non sono stati riscontrati. Il gene *sopE1*, presente sul batteriofago sopEΦ era presente nell'86,4% dei ceppi. In generale, non sono state evidenziate differenze rilevanti tra le frequenze dei geni negli isolati da diversa origine. I profili di virulenza prevalenti sono stati *ssaQ-mgtC-sopB-sopE1-bcfC* (50.0%) e *ssaQ-mgtC*-spi_4D-*sopB-sopE1-bcfC* (27,3%). I due profili erano distribuiti in modo simile tra le diverse fonti.

La correlazione genetica tra i ceppi è mostrata in figura 1. L'analisi evidenza 1 *major cluster* (A) e 5 *minor cluster* (B, C, D, E, F), mentre 8 ceppi sono totalmente non correlati (coefficiente di similitudine <80%). Il cluster A include 20 ceppi (6 uomo, 3 animali, e 11 da ambiente). 9/11 ceppi ambientali (4 del 2001 e 5 del 2002) appartenenti al cluster A provengono dalla provincia di Varese. In generale non sono state osservate correlazioni tra il profilo di PFGE e il profilo di virulenza.

In conclusione dai risultati ottenuti si evince che:

- i ceppi di *Salmonella* Napoli posseggono geni di virulenza paragonabili a quelli dei principali sierotipi coinvolti nelle infezioni enteriche umane;
- vi è una variabilità tra i ceppi ma un clone principale sembra circolare in Italia;
- ad esso appartengono ceppi umani, animali e ambientali, dato che supporta l'ipotesi che l'ambiente possa rappresentare un fattore di rischio per le infezioni da *S*. Napoli nell'uomo.
- un gruppo di ceppi tra loro correlati sembra circolare in Lombardia dal 2001.

Ulteriori informazioni sono necessarie per capire meglio l'epidemiologia di questo sierotipo e i suoi possibili *reservoir*.

BIBLIOGRAFIA

1. Foley SL, Zhao S, Walker RD. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of Salmonella foodborne pathogens. Foodborne Pathog Dis. 2007 Fall;4(3):253-76. Review.
2. Soto, S. M., I. Rodriguez, M. R. Rodicio, J. Vila, and M. C. Mendoza. 2006. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. J Med Microbiol 55:365-373.
3. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol Rev. 2009 Mar;33(2):376-93. Epub 2008 Oct 29. Review.
4. Fisher IS, Jourdan-Da Silva N, Hächler H, Weill FX, Schmid H, Danan

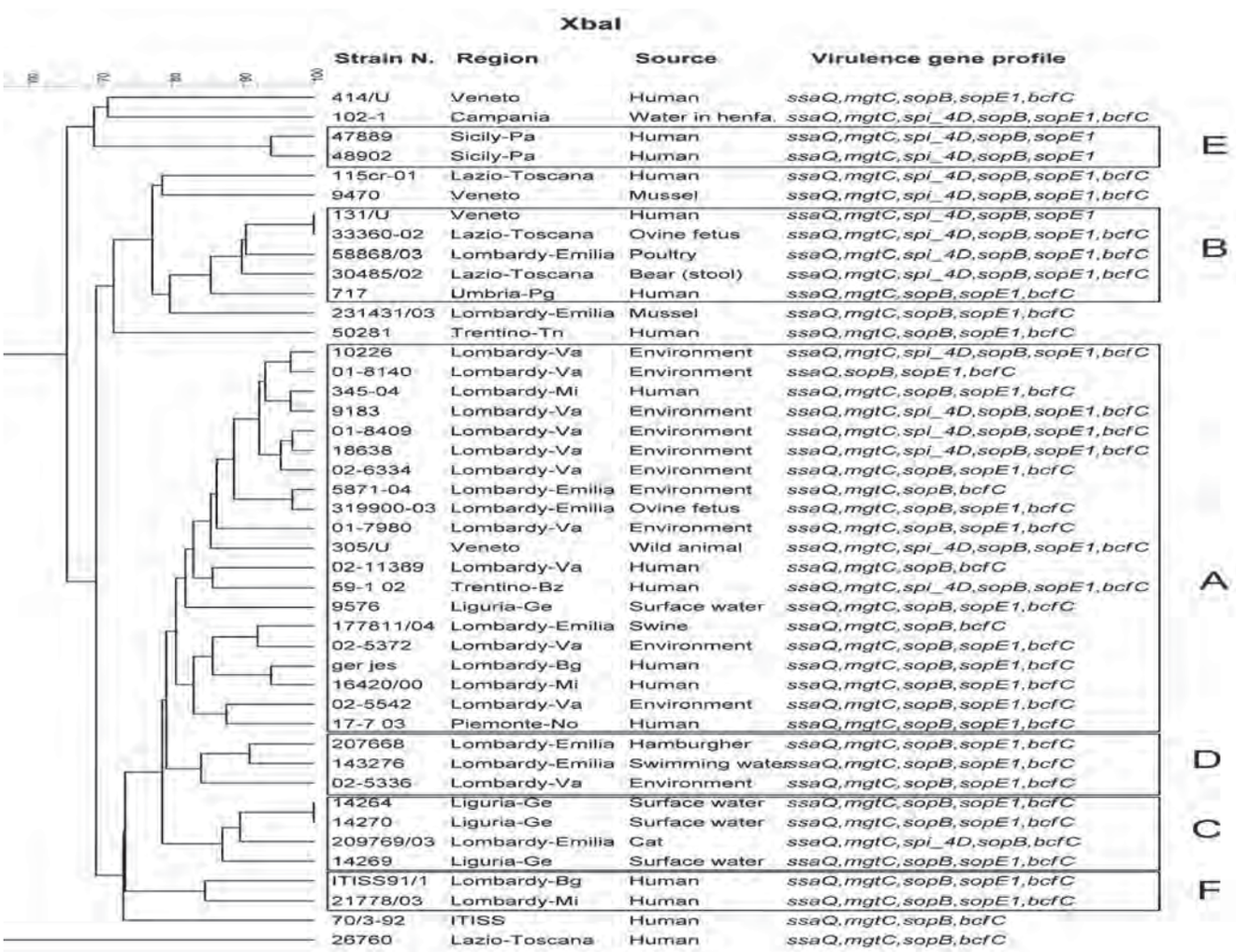
C, Kérouanton A, Lane CR, Dionisi AM, Luzzi I. Human infections due to Salmonella Napoli: a multicountry, emerging enigma recognized by the Enter-net international surveillance network. Foodborne Pathog Dis. 2009 Jun;6(5):613-9.

5. Greenwood MH, Hooper WL. 1983. Chocolate bars contaminated with *Salmonella* Napoli: an infectivity study. Br Med J (Clin Res Ed). 30; 286(6375):1394.
6. Gill ON, Sockett PN, Bartlett CL, Vaile MS, Rowe B, Gilbert RJ, Dulake C, Murrell HC, Salmaso S. 1983. Outbreak of *Salmonella* Napoli infection caused by contaminated chocolate bars. Lancet 12;1(8324):574-7.
7. Carmeni A. Salmonella strains in southern Italy and in Sicily during 1962-1965. Ig Mod. 1966 Mar-Apr;59(3):127-32.
8. Huehn, S., Bunge, C., Junker, E., Helmuth, R., Malorny, B. 2009. Poultry-Associated *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar 4,12:d: - Reveals high clonality and a distinct pathogenicity gene repertoire. Appl Environ Microbiol 75(4):1011-20.
9. Guerra, B., I. Laconcha, S. M. Soto, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza. 2000. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. FEMS Microbiol Lett 190:341-347.
10. Herrero, A., M. R. Rodicio, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza. 2006. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. J Antimicrob Chemother 57:39-45

Tabella 1. Distribuzione dei geni di virulenza nei ceppi di *S.* Napoli isolati da diversa origine.

Gene	*Salmonella* Napoli (No=44)				
	Totale	Uomo (No=17)	Animale (No=9)	Alimento (No=1)	Ambiente (No=17)
	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)
avrA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
spvC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
gipA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
sodC1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ssaQ	44 (100.0)	17 (100.0)	9 (100.0)	1 (100.0)	17 (100.0)
sopB	44 (100.0)	17 (100.0)	9 (100.0)	1 (100.0)	17 (100.0)
mgtC	43 (97.7)	17 (100.0)	9 (100.0)	1 (100.0)	16 (94.1)
bcfC	41 (93.2)	14 (82.3)	9 (100.0)	1 (100.0)	17 (100.0)
sopE1	38 (86.4)	14 (82.4)	7 (77.8)	1 (100.0)	16 (94.1)
spi_4D	16 (36.4)	5 (29.4)	6 (66.7)	0 (0)	5 (29.4)

Figura 1. Analisi mediante Elettroforesi in Campo Pulsato



IL VACCINO IBR-DELETO: CONFRONTO DEI RISULTATI DEL MONITORAGGIO IN VALLE D'AOSTA DAL 2006 AL 2009

Guidetti C., Palermo P., Ferraris M., Navillod F., Mancano A. & Orusa R.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'AOSTA/sc Aosta-Cermas

aosta.ibr@izsto.it

Key words: BHV-A; ELISA; EPIDEMIOLOGIA IBR

INTRODUZIONE

La Rinotracheite infettiva dei Bovini (IBR-IPV) è una malattia virale sostenuta da BHV-1, DNA-virus appartenente alla famiglia *Herpesviride,* sottofamiglia *Alphaherpesvirineae, g*enere *Varicellovirus.*

Nella specie virale BHV 1 si distinguono tre genotipi ciascuno dei quali possiede diverse proprietà biologiche:

- il tipo 1 è responsabile di rinotracheite, congiuntivite e encefalite;
- il tipo 2 dà infezioni genitali nel maschio e nella femmina;
- il tipo 3 dà encefaliti nei vitelli.

Il virus è antigenicamente uniforme, esistono solo minime variazioni negli epitopi superficiali.

L'envelope degli alpha herpesviruses recano glicoproteine funzionalmente e strutturalmente omologhe, importanti per l'interazione del virus con l'ospite. Le tre principali glicoproteine, gB, gO e gD sono state identificate sull'envelope e sulle membrane delle cellule-ospite infettate.

La forma respiratoria necessita di un tempo di incubazione breve e manifesta sintomi quali febbre fino a 42°, aumento della frequenza respiratoria, scolo nasale da mucoso a muco-purulento, tosse e congiuntivite.

La forma genitale (IPV) si manifesta invece con infiammazione della mucosa degli apparati maschili e femminili, aborto ed infertilità.

I siti di penetrazione preferenziali per il virus sono la mucosa respiratoria e quella genitale. Inoltre, le dimensioni virali consentono l'attraversamento della barriera placentare causando aborti che si verificano solitamente tra il quinto e l'ottavo mese di gravidanza.

Dopo attiva moltiplicazione a livello delle cellule epiteliali della mucosa, il virus si diffonde attraverso il sangue e il sistema nervoso, risalendo i nervi per via retrograda e per congruità da una cellule all'altra senza stimolare la risposta anticorpale dell'organismo (infezione latente).

La fonte principale di infezione è il bovino infetto. Alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di infezione naturale anche per la capra, il cervo e il bufalo. L'infezione si verifica per contatto diretto per via aerogena, specie in condizioni di sovraffollamento, o per via venerea.

La rinotracheite infettiva bovina negli ultimi anni è stato oggetto di specifici piani di monitoraggio sierologico a causa dei danni sanitari direttamente provocati e dell'importanza di natura commerciale della malattia. Per contrastare tale patologia, la Regione Autonoma Valle d'Aosta ha avviato un piano di monitoraggio sierologico annuale associato ad un'adeguata campagna vaccinale basata su l'impiego di vaccini marker gE deleti che consentono la distinzione tra capi infetti e capi vaccinati.

L'adozione di piani di controllo su scala regionale dovrebbe rappresentare uno strumento per favorire il processo di eradicazione offrendo garanzie di tutela degli allevamenti indenni o comunque impegnati nell'eradicazione. Pertanto, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di confermare la validità del piano e di verificare l'efficacia della vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Il monitoraggio sierologico della malattia avviene mediante test immunoenzimatico per la ricerca di anticorpi contro il virus BHV1.

In particolare, i capi che vengono identificati come "negativi" dall'anno precedente vengono sottoposti a screening per la presenza di anticorpi totali.

Illustrazione 1: Spettrofotometro per i test ELISA

Gli animali definiti come "vaccinati" sono sottoposti a test anti-IBR gE. I vaccini utilizzati presentano la delezione dell'antigene gE, il test può differenziare efficacemente gli animali infettati naturalmente da quelli vaccinati.

Per i campioni definiti come "borderline" (1,2) (positivi al test per gli anticorpi totali, con un range % di densità ottica compreso tra 45% e 200%) è stato eseguito anche il test ELISA gB che consente, grazie ad una maggiore sensibilità e specificità, di identificare con maggiore puntualità lo stato sanitario dei capi testati.

Per quanto concerne l'analisi statistica dei dati, è stato utilizzato il software statistico STATA® con i dati estrapolati dal sistema informativo SIGLA, integrando gli stessi con i dati provenienti dall'Ufficio Bonifica Valdostana.

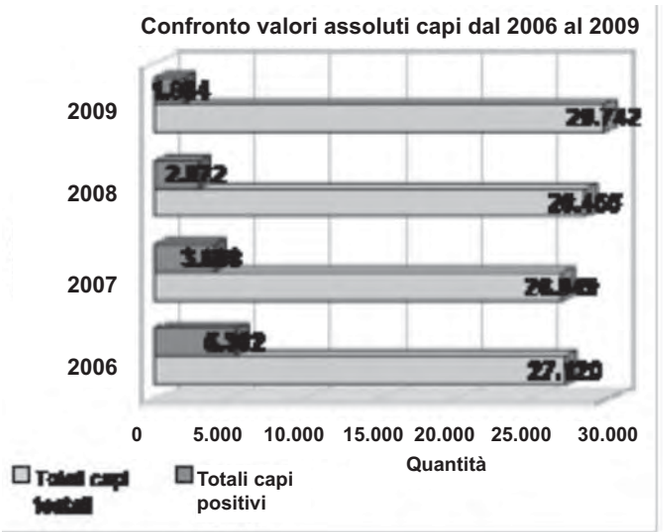
RISULTATI E DISCUSSIONE

Il monitoraggio ha confermato la validità dello strumento vaccinazione per il controllo della malattia evidenziando una diminuzione pari al 13% rispetto al 2006 dei capi positivi al test ELISA di screening.

L'analisi dello stato sanitario aziendale ha permesso di evidenziare una diminuzione della prevalenza (dal 45% del 2006, al 26% nel 2009).

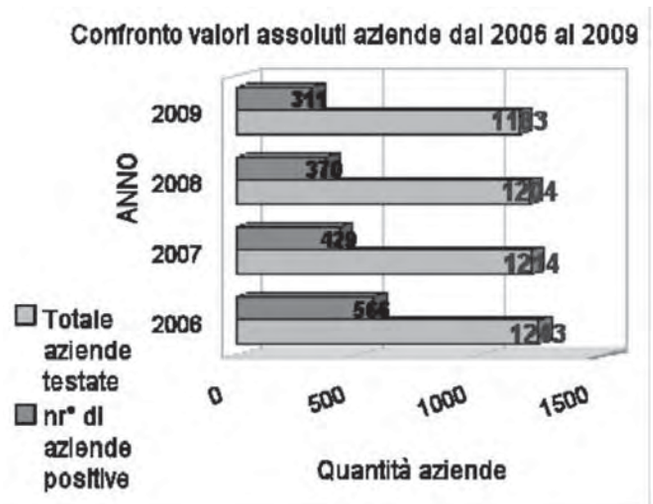
Verificando le variazioni nel corso degli anni, tramite l'utilizzo dei numeri indice a base fissa (2006), si evidenzia il trend discendente delle aziende positive.

Confronto grafico dei numeri indici che evidenziano la diminuzione delle aziende positive.



Verificando le variazioni nel corso degli anni, tramite l'utilizzo dei numeri indice a base fissa (2006), si evidenzia il trend discendente delle aziende positive.

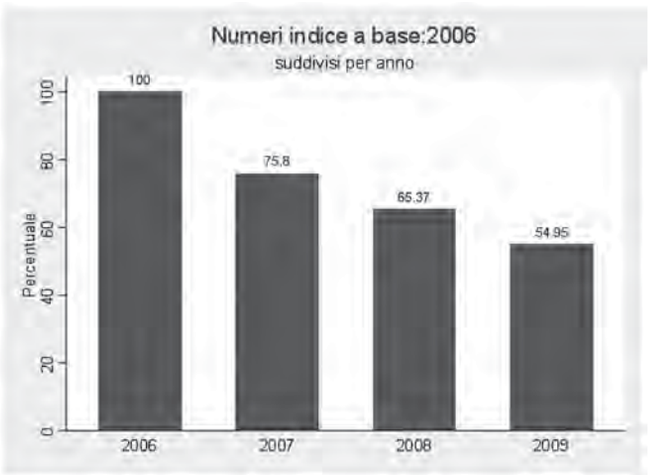
Confronto grafico dei numeri indici che evidenziano la diminuzione delle aziende positive.



In base a studi eseguiti in Germania (3) è emerso che alcune tipologie di ungulati selvatici (cervidi) risultano particolarmente sensibili all'infezione da BHV-1; inoltre è stata constatata la potenziale interazione dei bovini in alpeggio con la fauna selvatica. Sarebbe perciò auspicabile un maggiore controllo di questi ultimi per il miglioramento della gestione della malattia.

Tabella dei numeri indice a base fissa: 2006

Anno di riferimento	prevalenza aziendale	Numero indice a base 2006	Riduzione % aziende positive	Dim. % aziende positivi rispetto all'anno prec	Dim. Ass. aziende
2006	45,53%	100,00%	**100,00%**	**100**	**100**
2007	35,34%	75,80%	-24,20%	-24,20%	-137
2008	30,73%	65,37%	-34,63%	-10,42%	-59
2009	26,74%	54,95%	-45,05%	-10,42%	-59



Inoltre, in futuro si prevede di georeferenziare gli allevamenti e differenziarli per stato sanitario, utilizzando appositi software come ArcMap® della ESRI®. Infine, attraverso il supporto di metodiche di biologia molecolare (Real time PCR, da sottoporre a validazione) (4), sarà possibile determinare con maggiore precisione l'efficacia del vaccino, permettendo la distinzione tra infezioni attive e latenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferraris M. et al., 2005, Utilizzo del metodo ELISA modificato con la tecnica di monitoraggio sul larga scala per la ricerca di anticorpi nei confronti di BHV1, VII Congresso Nazionale SIDILV 26/28 ottobre.

2. Ferraris M. et al., 2008, Rinotracheite Infettiva Bovina: studio sui campioni borderline al test ELISA per la ricerca degli anticorpi contro BHV1, X Congresso Nazionale SIDILV 22/24 ottobre

3. Frolich K. Et Al., 2006, Serological survey for potential disease agents of free-ranging cervids in six seleceted national parks from Germany, Journal of Wildlife Diseases, 49: 836-843.

4. Watzinger F., Ebner K., Lion T., 2006, Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR, Molecular Aspects of Medicine, 27: 254-298.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato supportato dal finanziamento della Regione autonoma Valle d'Aosta.

SUMMARY

In this study we compared different years of in the Infectious Bovine Rinotracheitits control programme. The results show that the situation in the epidemiology of the disease is stable and that the execution of three types of different ELISA test is the preferred method to minimize any risk of false positive and false vaccinated samples.

LA BATTERIOLOGIA TONSILLARE NELLA VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI OPPORTUNISTICHE DEL SUINO

Gusmara C. [1], Invernizzi F. [2], Valnegri L. [2], Colombo A. [3], Sala V. [1]

[1] DIPAV – Sezione di Malattie Infettive – Università di Milano

[2] Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche

[3] A.S.L. Provincia di Como – Servizio Veterinario

Key words: amigdale, esame batteriologico, batteriosi opportunistiche.

RIASSUNTO. Sono state esaminate 100 amigdale prelevate da partite di macellazione provenienti da 10 aziende suinicole della pianura padana.
Attraverso gli esami batteriologici di omogenati dello stroma tonsillare sono stati evidenziati alcuni dei microrganismi opportunisti presenti nella produzione suinicola intensiva; alla luce dei risultati ottenuti, la batteriologia applicata a campionamenti tonsillari dei lotti di macellazione può essere considerata un possibile strumento per la qualificazione epidemiologica dei cicli di produzione nei confronti delle batteriosi opportunistiche di complicanza.
Il metodo è facilmente applicabile e relativamente economico, soprattutto considerando le informazioni ottenibili, in una prospettiva di monitoraggio della produzione e di sorveglianza attiva sulla qualità della microbizzazione delle partite di macellazione, soprattutto nei confronti degli agenti zoonosici; per questa via, è inoltre possibile valutare in termini evolutivi temporali le antibiotico-sensibilità, migliorando le medicazioni strategiche in una logica di correttezza della gestione sanitaria aziendale.

Summary. 100 palatine tonsils sampled from slaughtering lots coming from 10 pig farms of Po valley have been examined.
The major opportunistic bacteria of the intensive pig production have been searched through bacteriological examination of tonsils homogenates. This screening system, periodically applied to the slaughter lots can be considered a promising tool for the epidemiological qualification of the production cycles towards the complicating opportunistic bacterial infections. The method is reliable and quite economic, considering the number and quality of available information.

INTRODUZIONE

Nella produzione suinicola, le informazioni provenienti dal macello indicano il livello quali-quantitativo della produzione, ma sono utilizzabili anche per qualificare lo stato sanitario aziendale; i monitoraggi al macello hanno costi contenuti, e sono riferibili sia alla storia clinica dei gruppi, sia ai risultati dei controlli sierologici *intra-vitam*. Infine, possono essere utilizzati per verificare l'efficacia degli interventi applicati in campo.
La presenza crescente dei virus ad attività immonudepressiva, ha trasformato il controllo delle batteriosi opportunistiche nella principale sfida sanitaria aziendale; inoltre, è sempre più indispensabile disporre di strumenti affidabili nella valutazione del rapporto costo-beneficio di tutte le soluzioni tecniche adottate.
Su queste basi, abbiamo ritenuto opportuno affiancare al sistema di valutazione dei punteggi polmonari, già applicato e standardizzato nel suino tradizionale italiano, un metodo d'indagine sulle tonsille prelevate nelle partite di macellazione, allo scopo di produrre informazioni rapide ed attendibili sulla presenza e circolazione di patogeni opportunisti nei cicli di produzione.
Lo screening batteriologico delle tonsille palatine prelevate al macello può quindi essere aggiunto a pieno titolo alle altre valutazioni possibili in questa sede, che riguardano oltre alle lesioni micoplasmiche di cui si è già detto, anche i turbinati per la rinite atrofica progressiva, le lesioni epatiche per l'ascaridiosi, la cute per la rogna sarcoptica e l'ileo per il complesso dell'adenomatosi intestinale.
Per la loro posizione strategica nell'orofaringe, le tonsille sono costantemente esposte agli stimoli antigenici e possono fungere da porta d'ingresso per diversi agenti infettivi: per via sierologica o biomolecolare si valutano i contatti pregressi o in corso con i patogeni, ma non è possibile identificare i sierotipi in proiezione vaccinale, o determinare la sensibilità agli antibiotici in proiezione terapeutica o preventiva; perciò, l'esame batteriologico delle tonsille, pur non essendo particolarmente innovativo, è, nella sua economicità, uno strumento in grado di fornire una molteplicità d'informazioni.

MATERIALI E METODI

Le amigdale sono state prelevate in due impianti di macellazione delle provincie di Como e di Lecco; gli allevamenti di provenienza delle partite di macellazione sono situati nelle provincie di Bergamo (tre), Cremona e Mantova (due), Brescia, Lodi e Cuneo (uno).
Per ciascuna partita di macellazione sono state prelevate, dalle teste già collocate sulle apposite rastrelliere, dieci coppie di tonsille; le stesse sono state immediatamente refrigerate e consegnate al laboratorio, con particolare attenzione a non interrompere la catena del freddo.
Le indagini batteriologiche sono state eseguite applicando i protocolli diagnostici in uso nel laboratorio di Patologia Infettiva del Suino della Sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria; per una verifica preliminare di fattibilità, sono stati individuati quattro patogeni opportunisti del suino: *Streptococcus suis, Staphylococcus hyicus, Salmonella* spp. e
Pasteurella multocida.
Il contenuto delle cripte di una tonsilla è stato raccolto con un tampone sterile dopo compressione manuale, inoculato su agar sangue di montone al 5%, poi incubato a 37°C per 24 ore.
Il parenchima residuale è stato sminuzzato (con forbici sterili), trasferito in un sacchetto sterile con 10 ml di acqua peptonata tamponata e omogeneizzato per un minuto; il prodotto così ottenuto è stato incubato a 37°C per 24 ore ed ha costituito il pre-arricchimento per la ricerca di *Salmonella* spp. Il passaggio di arricchimento è stato eseguito in Muller-Kaufmann broth (24 ore a 37°C) e la semina selettiva su XLT4 agar (24 ore a 37°C).
Da ciascuna tonsilla sono state visivamente identificate e isolate (da agar XLT4 per *Salmonella* spp. e da agar sangue per gli altri batteri) almeno cinque colonie sospette; dopo le opportune tipizzazioni confermative, su base biochimica e sierologica, la ricerca è stata considerata positiva a fronte dell'identificazione certa di almeno una di esse.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle successive; in tabella 1 è riportata la numerosità degli isolamenti di tutte le specie batteriche per ciascun lotto di tonsille, mentre in tabella 2 sono stati calcolati i valori percentuali degli isolamenti stessi rispetto al totale di ciascun campionamento.
Dalle 100 tonsille esaminate, sono stati isolati 22 ceppi di

Salmonella spp, 30 di *P. multocida*, 34 di *S. suis* e 36 di *S. hyicus*; la presenza delle specie batteriche nei dieci lotti è molto variabile, e l'unica presente in tutte le ricerche è *S. suis*, a conferma della diffusione e della connotazione tipicamente enzootica di questa batteriosi, in grado di determinare infezioni croniche nelle scrofe e presenza sistematica nella loro discendenza.

Tabella 1. Numero di isolamenti su 10 tonsille per azienda.

Azienda	*Salmonella spp.*	*P. multocida*	*S. suis*	*S. hyicus*
A	1	3	6	4
B	8	4	2	5
C	0	1	6	4
D	5	0	3	3
E	0	4	2	5
F	2	4	4	3
G	3	2	4	3
H	1	5	1	2
I	0	2	2	0
L	2	5	4	7

Tabella 2. Percentuali d'isolamento su 10 tonsille per azienda.

Azienda	Salmo*nella spp.* %	*P.multocida* %	*S. suis* %	*S. hyicus* %
A	10	30	60	40
B	80	40	20	50
C	0	10	60	40
D	50	0	30	30
E	0	40	20	50
F	20	40	40	30
G	30	20	40	30
H	10	50	10	20
I	0	20	20	0
L	20	50	40	70

P. multocida e *S. hyicus* sono assenti solo in un lotto, *Salmonella* in tre, ma a conferma della caratterizzazione epidemiologica tipicamente "aziendale" di questa infezione, nel lotto B è presente nell'80% delle tonsille esaminate.
Tra l'altro, l'azienda di provenienza del lotto B è quella con la numerosità più elevata d'isolamenti (19) seguita da quella del lotto L (18) dove è particolarmente rappresentato *S. hyicus* (70% di positività tonsillare, altra infezione caratteristicamente enzootica); le aziende H e I, con 9 e 4 isolamenti totali, danno, in questo primo screening l'immagine di un management ambientale in grado di ridurre la circolazione delle infezioni opportunistiche e non è casuale che nell'azienda I siano assenti le salmonelle, che sono, tra tutti i batteri considerati, quelli provvisti di maggior capacità di sopravvivenza extra-animale.
È interessante la situazione delle aziende C ed E che, pur negative per *Salmonella*, mostrano numerosi isolamenti delle altre tre specie batteriche; in questo caso, considerando la scarsa resistenza ambientale di queste ultime, è possibile ipotizzare la presenza di condizioni manageriali predisponenti la trasmissione interanimale stretta di queste infezioni.

CONCLUSIONI

In primo luogo, ci pare ampiamente conseguito l'obiettivo principale di questo lavoro, che consisteva nella verifica della possibilità di utilizzare i lotti di tonsille prelevati in macello per qualificare i livelli di circolazione dei batteri opportunisti in azienda; le differenze nel numero e nella tipologia degli isolamenti rappresentano un'oggettiva garanzia riguardo all'affidabilità dell'approccio diagnostico, in grado di evidenziare le differenti situazioni nello stato sanitario delle partite di macellazione e quindi dei cicli produttivi che le hanno generate.
Sulla base dei risultati ottenuti, crediamo di poter affermare che le indagini batteriologiche, mirate sugli stromi tonsillari, permettono di evidenziare i microrganismi opportunisti di ciclo nella produzione suinicola intensiva; il metodo utilizzato si rivela, a una prima analisi, uno strumento di monitoraggio valido, applicabile ed economico rispetto al numero di informazioni fornite.
Se correttamente impiegato, può essere in grado di qualificare, rapidamente e ripetutamente, prima di tutto il rischio epidemiologico individuale e di conseguenza quello clinico aziendale; inoltre, l'analisi contestuale di questi dati rispetto a quelli diagnostico-sperimentali di ciclo (indagini sierologiche, virologiche, batteriologiche e biomolecolari) e agli altri rilievi di macellazione (punteggio polmonare per *M. hyopneumoniae*) può avere un valore predittivo rispetto alle interazioni eziologiche nell'ambito del complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC), che rappresenta, ancora oggie più che mai, la principale causa di problemi sanitari e perdite produttive. Perciò, a ulteriore integrazione si possono agevolmente utilizzare i dati zootecnici di ciclo e quelli di macello. Tra questi ultimi, assumono rilevante importanza i pesi totali e differenziali delle partite di macellazione, il mese di nascita dei suini che le compongono e la classificazione EUROP delle carcasse.
È infine chiaro che un impiego realmente efficace del metodo presuppone l'organizzazione di una metodologia d'intervento aziendale e di macello, con la ripetizione periodica e programmata del rilievo, la registrazione e la gestione dei risultati e la loro analisi rispetto alle condizioni manageriali e sanitarie e alle soluzioni correttive applicate.
L'obiettivo finale, a nostro parere ampiamente conseguibile, è l'identificazione dei punti critici nella gestione aziendale e, attraverso il loro controllo, la riduzione del rischio sanitario e produttivo.

BIBLIOGRAFIA

- Baele M., Chiers K., Devriese L.A., Smith H.E., Wisselink H.J., Vaneechoutte M., Haesebrouck F. (2001). The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. Journal of Applied Microbiology. 91: 997-1003.
- Horter D.C., Yoon K.J., Zimmermann J.J. (2003). A review of porcine tonsils in immunity and disease. Animal Health Research Reviews. 4 (2): 143-155.
- Sala V. e Cabrini L. (2005). Il macello come strumento di monitoraggio aziendale. Summa. 22 (3): 19-25.
- Williams D. M., Rowland A. C. (1972). The palatine tonsils of the pig. An efferent route to the lymphoid tissue. Journal of Anatomy. 113: 131-137.

IL PRINCIPIO DI PARETO: STRUMENTO DI MIGLIORAMENTO CONTINUO DELLA QUALITA'

Guzzo S., Moriconi M., Palleschi G., Tardiola A. Guarducci M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Key words: rapporti di non conformità (RNC), principio di Pareto, miglioramento continuo

ABSTRACT
The authors report the experience on the use of Pareto diagrams and usefulness that they are in continuous quality improvement and in identifying the critical points of the systems for quality management.

INTRODUZIONE
Sono tre le finalità principali dell'attività dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, ente di ricerca scientifica veterinaria presente sul territorio italiano da più di 90 anni: tutelare la sanità e il benessere animale, controllare l'igiene degli allevamenti per la qualità delle produzioni primarie, garantire la sicurezza degli alimenti di origine animale e degli alimenti zootecnici per assicurare la salute del consumatore. Le attività legate a queste finalità sono gestite secondo criteri e norme di qualità; per la sicurezza alimentare, ad esempio, il Reg. CE 2073/2005 elenca i metodi di prova da utilizzare per la ricerca dei microrganismi nei prodotti alimentari.
In generale la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura" contiene i principi che i laboratori di prova, che attuano un sistema di gestione per la qualità, devono soddisfare per la sicurezza alimentare.
L'intero processo di attività è tenuto sotto controllo attraverso l'uso degli strumenti della qualità. La garanzia di conformità del sistema è un criterio fondamentale di assicurazione di qualità.
La gestione delle non conformità, azioni correttive e preventive è un requisito della norma: infatti l'individuazione delle cause e la valutazione dei problemi generatesi permettono di pianificare azioni per il miglioramento continuo. Il laboratorio che opera in base alla UNI CEI EN ISO/IEC 17025 deve migliorare costantemente l'efficacia del sistema di gestione attraverso l'uso della politica e gli obiettivi per la qualità, i risultati degli audit, l'analisi dei dati, il monitoraggio delle azioni correttive e preventive ed effettuando annualmente il riesame della direzione (2).
Nell'analisi delle situazioni non conformi è stato applicato il principio di Pareto, metodologia statistica utilizzata in economia per individuare i problemi più rilevanti e le priorità di intervento (3).

MATERIALI E METODI
La procedura gestionale delle situazioni non conformi è funzionale all'individuazione delle cause all'origine degli scostamenti.
La procedura prevede un'indagine retrospettiva per definire l'origine delle cause dei problemi che hanno determinato le azioni correttive e preventive.
L'Istituto inoltre monitora i risultati delle azioni preventive e correttive adottate per verificare che siano risultate efficaci. Annualmente in occasione del riesame della direzione viene effettuata l'analisi delle non conformità, azioni correttive e preventive al fine di pianificare gli interventi sul sistema per l'anno successivo. L'analisi è supportata da rappresentazioni grafiche tra cui i diagrammi di Pareto.
Nel 1897 Vilfredo Pareto (1848-1923) uno dei maggiori economisti italiani, studiando la distribuzione dei redditi, dimostrò che in una data regione solo pochi individui possedevano la maggior parte della ricchezza. Questa osservazione ispirò la cosiddetta "legge 80/20" dalla quale si evince che in genere l'80% dei risultati dipende dal 20% delle cause. Nel nostro studio relativo ai sistemi qualità ha trovato l'applicazione nella gestione delle conformità: infatti il 20% delle non conformità di un processo produttivo genera l'80% di quelle totali.
Abbiamo analizzato le non conformità che influenzano in modo significativo i risultati finali di un processo quali l'esecuzione delle prove e l'emissione del rapporto di prova. I dati sono stati rappresentati su un istogramma; al grafico della distribuzione percentuale si affianca il grafico delle frequenze cumulate.

RISULTATI
Nel 2008 sono stati gestiti in totale di 391 rapporti di non conformità (RNC).
Dal 2006 al 2008 si è avuto un decremeto statisticamente significativo (regressione lineare: $y = -25,5x + 461$ $R^2 = 0,8369$) (tabella n. 1).

Anno	Numero	Aumento/Decremento
anno 2006	442	
anno 2007	397	-10,2
anno 2008	391	-1,5

Tabella n° 1. RNC gestiti dal 2006 al 2008

Nella figura n° 1 è rappresentato il diagramma di Pareto relativo ai RNC rilevati dal personale operante nei laboratori nell'anno 2008.
Dal 2006 al 2008 (grafici disponibili presso gli autori) emerge una diminuzione delle non conformità relative alle apparecchiature (nel 2006 incidevano per l'80% su quelle totali). Nel 2007 e nel 2008 scende il numero delle non conformità relative alle apparecchiature (84,4% nel 2006, 77,5 % nel 2007 e 74,6 % nel 2008) che, nonostante il decremento, rimangono uno degli elementi più critici insieme ai controlli di qualità interna.

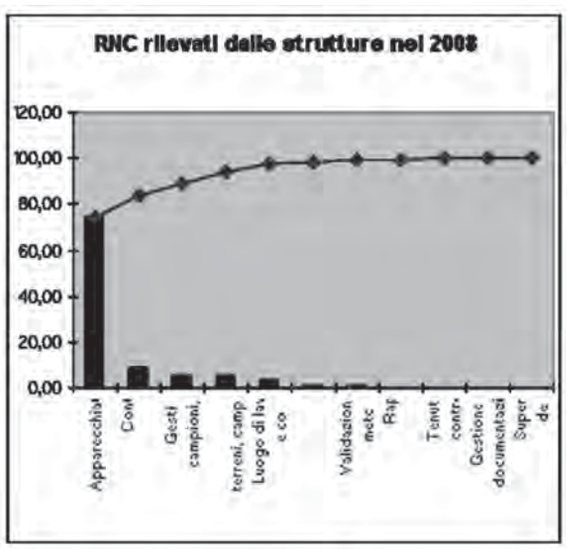


Figura n° 1 Diagramma di Pareto per i RNC rilevati dai laboratori

Dall'analisi dei RNC rilevati in sede di verifica ispettiva interna (figura n° 2), emerge che nel 2008 le criticità maggiori sono da imputarsi alla gestione della documentazione, all'abilitazione e al mantenimento della qualifica del personale e ai rapporti di prova. Nel triennio 2006-2008 si osserva un decremento significativo per i RNC relativi alla gestione della documentazione (dal 31% del 2006 al 24% del 2008) e alle apparecchiature (dal 21% del 2006 al 6% nel 2008).

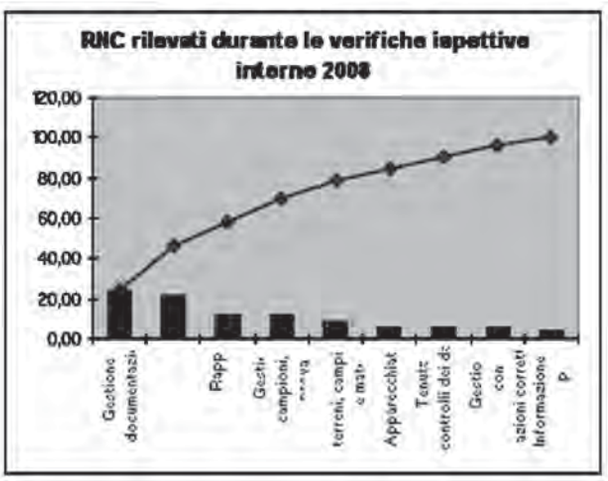


Figura n° 2 Diagramma di Pareto per i RNC rilevati durante le verifiche ispettive interne

Dall'analisi dei RNC rilevati dall'ente di accreditamento (figura n° 3) emerge che i punti critici sono molteplici ma che ognuno di essi da solo influenza poco il sistema che pertanto è molto stabile e non ci sono punti critici tali da determinare un vero e problema.

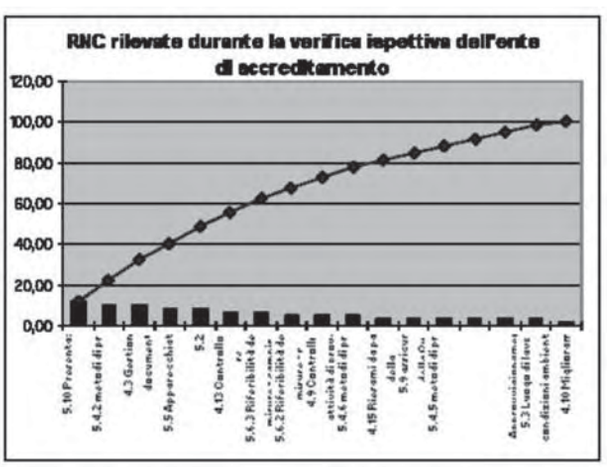


Figura n° 3 Diagramma di Pareto per i RNC rilevati durante la verifiche ispettive dell'ente di accreditamento

DISCUSSIONE

Il diagramma di Pareto, consente di presentare i dati con notevole efficacia comunicativa e visiva delle aree dove intervenire prioritariamente e facilita l'individuazione dei processi decisionali. L'analisi sistematica delle non conformità permette di programmare l'attività dell'anno successivo e di intervenire sui punti critici del sistema.
Dall'osservazione dell'80% delle non conformità è stata individuata un'azione correttiva mirata al miglioramento della gestione documentale e finalizzata alla riduzione delle criticità. Questi gli interventi pianificati e realizzati: formazione del personale interno sui temi inerenti la documentazione, revisione della procedura gestionale relativa ed il passaggio alla gestione su formato digitale dei documenti del sistema qualità.
La rappresentazione dei dati medianti i grafici, è molto più efficace delle tabelle nella valutazione di un fenomeno, è flessibile e facile da applicare in numerosi campi, permette di confrontare con facilità due rappresentazioni dello stesso evento relative a tempi o a condizioni differenti e quindi di evidenziare il miglioramento raggiunto (4).

BIBLIOGRAFIA

1) UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 "Requisiti per la competenza dei laboratori di prova e taratura"
2) UNI ISO/TR 10017: 2007 "Guida alle tecniche statistiche per la ISO 9001: 2000"
3) H. Graeb, D. Mueller-Gritschneder, U. Schlichtmann. Pareto optimization of analog circuits considering variability. International Journal of Circuit Theory and Applications. Volume 37, Issue 2, Date: March 2009, Pages 283-299.
4) W.H.Zhang. On the Pareto optimum sensitivity analysis in multicriteria optimization. International Journal for Numerical Methods in Engineering. volume 58. Issue 6, Date: 14 october 2003, Pages: 955-977

INDAGINE SULLA PRESENZA DI ACIDO BENZOICO E BENZOATI NEI FORMAGGI: CONTRIBUTO ALLA STIMA DI UN LIMITE AMMISSIBILE

Iammarino M., Di Taranto A., Cristino M., Colucci C.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Dipartimento di Chimica, Foggia

Key words: Acido Benzoico, Formaggi, Cromatografia ionica

SUMMARY
The benzoic acid and its salts are commonly additive used in food industry. Their employment is not allowed nevertheless in the dairy products, but just in these products a natural presence of these compounds can be found. In this work various typologies of cheese have been tested, for a total of 100 samples with the purpose to establish the maximum concentration of benzoic acid that can be considered as "natural" and that can be therefore admitted in cheeses. The analysis have been carried out by a validated ion chromatography with electrochemical detection technique.

INTRODUZIONE
L'acido benzoico ed i suoi sali rientrano nella categoria dei conservanti, vengono indicati con le sigle da E210 a E219. Esplicano un'attività antimicrobica attraverso un meccanismo di inibizione degli enzimi ossiglutarato deidrogenasi e succinato deidrogenasi del ciclo di Krebs e di alcuni enzimi coinvolti nella fosforilazione ossidativa. Possono essere aggiunti a svariati prodotti alimentari, dai prodotti a base di pesce ai brodi di carne, dalle salse (maionese, senape) alle bibite gasate, dagli ovoprodotti ai prodotti a base di frutta e ortaggi, ecc. Per ciascuno di questi prodotti è previsto, dalla legislazione vigente, uno specifico limite di impiego che può variare dai 150 mg/l relativo alle bibite gasate, ai 5000 mg/kg relativo agli ovoprodotti (1). Si tratta di limiti di impiego tutto sommato abbastanza elevati in quanto l'acido benzoico e i benzoati non possono essere considerati additivi particolarmente pericolosi per la salute umana. Secondo diversi autori infatti l'acido benzoico è un prodotto innocuo alle dosi di impiego e non presenta problemi di accumulo in quanto viene completamente eliminato con le urine sotto forma di acido ippurico. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (FAO/OMS), è ipotizzabile un limite di tossicità giornaliero di 5 mg/kg e cioè, per esempio, da 300 a 400 mg per soggetti da 60 a 80 kg di peso corporeo. Alle dosi giornaliere ritenute accettabili (300-400 mg nell'adulto) l'acido benzoico non presenta problemi di tossicità, salvo alcuni occasionali fenomeni allergici in soggetti sensibili al principio attivo, quali riniti, orticarie, dermatiti. Sovradosaggi, a partire da 1000 mg al giorno per 5 giorni consecutivi, causano nausea, mal di testa, astenia, bruciori esofagei. L'acido benzoico e i benzoati, essendo composti intermedi biologicamente attivi nella sintesi di altre sostanze (2) possono essere naturalmente presenti in molti prodotti alimentari, sia di origine vegetale che di origine animale, ivi compresi i prodotti lattiero-caseari (3), (4). Tuttavia sorge un'incongruenza, proprio nei prodotti lattiero-caseari (fatta eccezione per latte acidulato, latte acidificato, yogurt, kefir e latticello, per i quali è previsto un limite d'impiego di 300 mg/kg) non è consentita, dall'attuale normativa, l'additivazione di acido benzoico e/o benzoati. Tale incongruenza può causare l'errata interpretazione di alcuni risultati relativi alle ispezioni effettuate su questa categoria di prodotto. Ovvero, sussistendo per gli Organi preposti al controllo, l'obbligo di denuncia di esito sfavorevole ai sensi dell'Art.15 comma 4 del D.M. 209/96, si può considerare come "positivo" un campione che, in realtà, non è mai stato addizionato con alcun conservante, e che, al massimo, può essere stato prodotto e/o conservato in condizioni non ideali, ma tali da non comprometterne la sicurezza igienico-sanitaria. Al fine di risolvere tale equivoco e colmare quella che si può considerare a tutti gli effetti una lacuna legislativa, è stato proposto e svolto un progetto di ricerca volto a definire, anche per l'acido benzoico, un limite di legge al di sotto del quale non sussista l'obbligo di denuncia per gli Enti preposti al controllo ufficiale, alla stregua di quanto già fatto per nitrati e nitriti nelle carni fresche (5); e di quanto si sta tuttora studiando per altri additivi "naturalmente" presenti in diversi prodotti alimentari.

MATERIALI E METODI
Al fine di stimare correttamente tale livello massimo accettabile, si è determinato l'acido benzoico (come ione benzoato) mediante una tecnica innovativa in HPLC di scambio ionico validata dal Dipartimento secondo il Regolamento della Commissione Europea N. 882/2004 del 29 Aprile 2004 (6). Con questa procedura l'acido benzoico viene estratto, purificato e determinato analiticamente come ione benzoato. Le tecnica dello scambio ionico si ottiene utilizzando materiali solidi impaccati (fasi fisse) ai quali sono fissati gruppi ionizzati o ionizzabili. Naturalmente, per mantenere il bilancio di carica, le cariche di ciascun gruppo legato allo scambiatore sono bilanciate dai controioni, ossia dagli ioni con carica opposta scambiabili. Per esempio la struttura dello scambiatore anionico utilizzato per l'analisi dei benzoati consta di gruppi trimetilammonio con una carica positiva, fissati sulla matrice, con controione OH^-. Per quanto riguarda la tecnica di rivelazione, nel nostro caso è stato impiegato un rivelatore elettrochimico conduttimetrico, ovvero il rivelatore tipico per le analisi di specie ioniche, separate per scambio ionico. Riassumendo, il sistema cromatografico a disposizione per questa ricerca è stato un cromatografo ionico Dionex DX500, equipaggiato con colonna IonPac AS11 4 x 250 mm, soppressore ASRS ultra II self-regenerating, software e PC per l'elaborazione dei dati. L'eluizione è stata impostata in gradiente con due fasi mobili a diversa concentrazione di NaOH. Per quanto concerne le fasi di estrazione e purificazione dei campioni, dopo la fine omogeneizzazione dei formaggi, e la susseguente pesata mediante bilancia analitica, è stata effettuata l'estrazione dei benzoati con acqua ultrapura, utilizzando il vortex per un minuto. Un'aliquota di circa 5-6 ml, prelevata dalla miscela così ottenuta, è stata quindi filtrata prima con filtri da 0.8 µm, quindi con filtri da 0.2 µm; tale filtrato è stato utilizzato per l'iniezione in loop da 25 µl. I campioni risultati positivi per acido benzoico sono stati confermati con altre due tecniche analitiche HPLC, una, sempre in cromatografia ionica, ma con diverso meccanismo di scambio ionico e l'altra in HPLC a fase inversa e rivelatore UV-DAD. L'analisi è stata effettuata in doppio su 100 campioni di formaggio a composizione nota, ovvero senza aggiunta di acido benzoico. Nella scelta sulle tipologie di formaggio da analizzare si è cercato di selezionare campioni che potessero rappresentare efficacemente il vasto panorama di prodotti esistente sul mercato e, dunque, sono stati analizzati formaggi a diversi stadi di maturazione, passando dall'analisi di formaggi freschi a quelli a pasta molle, a pasta filata, a pasta dura e così via. Sono stati presi in considerazione formaggi provenienti da diverse aree geografiche italiane e prodotti sia con latte vaccino che con latte pecorino e misto.

RISULTATI E DISCUSSIONE
Sono stati analizzati complessivamente 100 campioni di formaggi caratterizzati da tecnologie di lavorazione, materie prime e luoghi di produzione diversi tra loro. Per una più

semplice interpretazione dei risultati ottenuti, tali formaggi sono stati suddivisi in sette categorie, e precisamente in: formaggi a pasta dura cotta a maturazione lenta (17 campioni), formaggi grattugiati preconfezionati (12 campioni), formaggi a pasta dura cotta a maturazione media (16 campioni), formaggi a pasta filata a maturazione media (17 campioni), formaggi a pasta filata a maturazione rapida (14 campioni), formaggi a pasta dura cruda a maturazione media (9 campioni) e formaggi freschi a maturazione rapida (15 campioni). La vasta gamma di campioni analizzati ci permette di poter trarre conclusioni valide per la maggior parte di formaggi reperibili sul mercato. I dati relativi alle analisi effettuate, espressi sia in termini di percentuale di presenza di acido benzoico sul totale di campioni analizzati, che in termini di concentrazione media riscontrata sui campioni positivi, sono riassunti in tabella 1. Il primo dato da sottolineare è quello della possibile presenza di acido benzoico in ciascuna delle sette categorie di formaggi analizzati, infatti, è stato registrato sempre almeno un positivo per ogni categoria. Pertanto, non è possibile escludere a priori la presenza "naturale" di acido benzoico in nessuna tipologia di formaggio, sia che questo venga prodotto con latte crudo o pastorizzato, che sia a maturazione rapida, media o lunga o che venga prodotto da latte vaccino o pecorino. Si ipotizza pertanto che la formazione di acido benzoico possa derivare da fattori comuni a tutte le tipologie di formaggio; tale sviluppo non appare facilmente controllabile dato che può presentarsi a prescindere dalla tecnologia di produzione e dalle caratteristiche della materia prima, dunque saranno necessari studi futuri più approfonditi per ricercare sia le cause che le modalità di prevenzione e/o limitazione di questo sviluppo. I risultati ottenuti ci hanno permesso di ottenere alcune importanti informazioni, utili per eventuali studi futuri sul meccanismo di formazione dell'acido benzoico nei formaggi. In particolare, è possibile mettere in evidenza una relazione tra concentrazioni riscontrate, percentuale di positivi e tipologia di formaggio. Si è notato come lo sviluppo di acido benzoico sia più probabile sui formaggi a pasta cruda che non su quelli a pasta filata o cotta; dunque si può ragionevolmente ipotizzare che i trattamenti termici possano inibire la formazione di questo composto inducendo nel prodotto una stabilizzazione microbiologica e/o una inattivazione enzimatica. A parità di trattamento termico effettuato, si è notato anche come lo sviluppo di acido benzoico sia tanto maggiore quanto più lunghi sono i tempi di maturazione del formaggio, questo dato lascia supporre che la presenza di acido benzoico nei formaggi sia strettamente correlata ai fenomeni di maturazione del prodotto, a prescindere dall'origine e dalla tipologia di materia prima. Sul totale di 100 campioni analizzati, in 18 casi è stata riscontrata presenza di acido benzoico superiore ai limiti di rivelabilità del metodo (8.8 mg/kg), e precisamente su due formaggi a pasta dura cotta a maturazione lenta, su tre formaggi grattugiati preconfezionati, su un formaggio a pasta dura cotta a maturazione media, su tre formaggi a pasta filata a maturazione media, su un formaggio a pasta filata a maturazione rapida, su cinque formaggi a pasta dura cruda a maturazione media e su tre formaggi freschi a maturazione rapida. Dunque la presenza di acido benzoico, in almeno uno dei campioni appartenenti alle sette categorie analizzate, fa si che la presenza "naturale" di questo composto non possa essere esclusa da nessuna tipologia di formaggio. La concentrazione media registrata sui campioni positivi è stata pari a 20.5 mg/kg, con un valore massimo pari a 28.7 mg/kg riscontrato in un formaggio a pasta dura cruda a maturazione media; dunque, considerata la distribuzione e l'entità delle concentrazioni rilevate, è plausibile stimare in 40.0 mg/kg il limite massimo ammissibile di acido benzoico nei formaggi. Nel caso in cui questo valore venga inserito come limite nella legislazione vigente, gli Enti preposti al controllo ufficiale degli alimenti non dovrebbero procedere dunque a denunce di alcun tipo nel caso vengano riscontrate concentrazioni inferiori a tale valore; questo in quanto concentrazioni così basse non derivano dall'aggiunta di alcun additivo, ma da una naturale formazione endogena dovuta, presumibilmente, a particolari meccanismi biochimici che avvengono durante le fasi di maturazione del formaggio.

Tabella 1 – *Risultati ottenuti sui 100 campioni di formaggio analizzati*

TIPOLOGIA DI FORMAGGIO	**N° Campioni analizzati**	**% POSITIVITÀ *Acido Benzoico***	**Conc. Media (mg/kg) *Acido Benzoico****
Pasta dura cotta (maturazione lenta)	17	11.8	11.6
Grattugiato preconfezionato	12	25.0	22.3
Pasta dura cotta (maturazione media)	16	6.3	20.3
Pasta filata (maturazione media)	17	17.6	24.7
Pasta filata (maturazione rapida)	14	7.1	22.2
Pasta dura cruda (maturazione media)	9	55.6	20.2
Fresco a maturazione rapida	15	20.0	22.2

* Media riferita ai soli campioni "positivi"

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di ricerca, grazie all'analisi di 100 campioni di formaggi di diversa tipologia, composizione ed origine, volte alla determinazione quali-quantitativa dell'acido benzoico, ci ha permesso di giungere alle seguenti conclusioni:

1) La formazione spontanea di acido benzoico può avvenire in qualunque tipologia di formaggio, a prescindere dalla tecnologia di produzione, dal tipo di latte e dalla zona di produzione;

2) Eventuali trattamenti termici effettuati nelle fasi di produzione possono rallentare e/o inibire la formazione di acido benzoico;

3) La formazione di acido benzoico è tanto più accentuata quanto più lunghi sono i tempi di maturazione del formaggio;

4) Considerata la distribuzione delle concentrazioni riscontrate nei campioni positivi, è plausibile stimare in 40 mg/kg il limite massimo ammissibile di acido benzoico nei formaggi, ovvero quel valore al di sotto del quale non dovrebbe sussistere obbligo di denuncia da parte degli Enti preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari.

BIBLIOGRAFIA

(1) D.M. 27 febbraio 1996 n°209 e successive modiche, Allegati XI e XII.

(2) Goodwin BL (1976) *Handbook of intermediary metabolism of aromatic compounds*. New York, NY, Wiley & Sons, pp. B6-B9.

(3) Bollettino dei Chimici Igienisti, vol. 47, 1996, pag. 279.

(4) Sieber R, Bütikofer U, Bosset JO, Rüegg M (1989) *Benzoesäure als natürlicher Bestandteil von Lebensmittelneine Übersicht*. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 80:345-362.

(5) Iammarino M., Muscarella M., Di Taranto A., Palermo C. *"Indagine sulla presenza di nitrati e nitriti in carni fresche"* – Atti LIX Convegno Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie. Viareggio 21-24 settembre 2005.

(6) *European Commission, Regulation (EC) No. 882/2004*, 29 April 2004, Journal of the European Union, L165, 1–141.

MORTALITA' IN LEPRI SELVATICHE (*Lepus europaeus,* Pallas, 1778) DELLE PROVINCE DI FIRENZE, PRATO E PISTOIA

Lombardo A., Ragona G., Dal Prà A., Paladini I., Piazza A., Tellini I., Taccori F., Corrias F., Brajon G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Firenze, Italy

Key words: Brown hare, heath control

INTRODUZIONE - La lepre rappresenta da sempre uno degli elementi che più caratterizzano il panorama faunistico toscano. A partire dagli anni 70 si è assistito a una notevole contrazione numerica, causata da più fattori limitanti. Ad oggi, le popolazioni presenti nelle province oggetto dell'indagine sono soprattutto il frutto di incroci di soggetti di diversa provenienza, introdotti a seguito di ripopolamenti con genotipi centro ed est-europei che hanno inquinato le forme autoctone (riferibili a *L. capensis*). La specie è presente su tutto il territorio delle 3 province, seppur con riduzioni numeriche nelle aree soggette alla caccia dopo le epoche di prelievo. La presenza costante della specie si rileva sicuramente nelle aree protette ed in particolare nelle Zone Ripopolamento e Cattura, ove la lepre costituisce specie di indirizzo. Questa indagine è finalizzata alla valutazione delle cause di morte e verifica dello stato sanitario delle carcasse di animali rinvenuti casualmente o durante le operazioni di ripopolamento e cattura, nelle province di Firenze, Prato e Pistoia dal 2006 ad oggi.

MATERIALI E METODI - Sono pervenuti alla Sezione di Firenze dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale 58 lepri provenienti sia da istituti faunistici finalizzati alla reintroduzione della specie, sia da popolazioni selvatiche. Gli animali sono stati sottoposti ad esame necroscopico: nei casi compatibili con eventuale avvelenamento e/o intossicazione, sono state effettuate analisi tossicologiche per la ricerca del principio attivo responsabile della *causa mortis* e segnalati all'autorità competente ai sensi della L.R. 39/2001; i casi riconducibili a trauma sono stati registrati; in relazione ai quadri anatomo-patologici osservati, sono stati effettuati approfondimenti diagnostici a carattere microbiologico, parassitologico e virologico. L'esame batteriologico è stato eseguito dagli organi prelevati in sede necroscopica, mediante semina diretta in terreni colturali solidi (agar sangue e terreni selettivi) e in brodi di arricchimento (brain heart infusion broth), verifica della presenza di crescita microbica dopo opportuna incubazione, identificazione delle colonie batteriche presenti mediante prove biochimiche in macro-metodo e di sistemi in micro metodo commerciali (api® bioMerieux). Gli esami parassitologici sono stati effettuati mediante flottazione del materiale fecale con soluzione sovra-satura di cloruro di sodio e mediante sedimentazione rapida; nei casi riconducibili a EBHS (European Brown Hare Syndrome) è stata ricercata la presenza dell'antigene da fegato dell'animale mediante test ELISA.

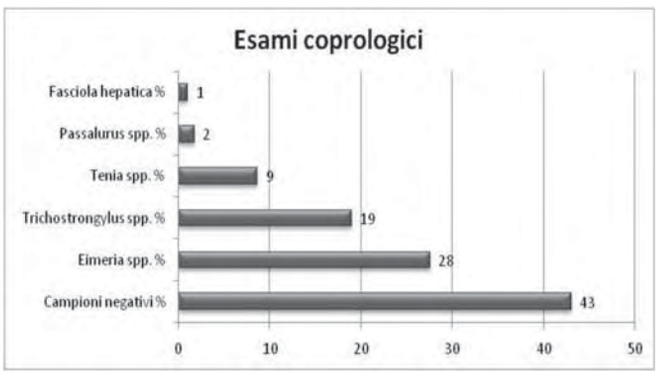
RISULTATI – Le morti causate da trauma o predazione sono state nel complesso 12. E' stato inoltre segnalato e confermato un caso di avvelenamento da anticoagulanti il cui principio è stato individuato dal fegato. Dai rimanenti 46 cadaveri sono risultati i patogeni indicati in tabella 1.

Tab.1: patogeni isolati

AGENTI PATOGENI ISOLATI	N° CASI
Yersinia pseudotuberculosis	5
EBHS	1
Pasteurella multocida	5
Bordetella bronchiseptica	3
Streptococcus bovis	2

Nel grafico 1 sono riportati i dati in percentuale delle analisi delle feci.

Graf.1: esami coprologici (dati in percentuale)



Tutti i casi di yersiniosi si sono verificati all'inizio della primavera, periodo indicato come favorevole nella patogenesi della malattia. Tale patogeno, isolato per la prima volta in provincia di Firenze (1), suscita un notevole interesse vista la trasmissibilità ed il carattere zoonotico. L'unico caso di EBHS è stato riscontrato presso un Centro Privato di Riproduzione Fauna Selvatica allo stato naturale (Art. 17 L.R. 3/94), ma non si conoscono dati di provenienza della lepre risultata positiva al test ELISA qualitativo. Le lesioni anatomo-patologiche riscontrate hanno riguardato prevalentemente il polmone e l'apparato respiratorio in generale: tutti gli isolamenti batterici sono stati effettuati infatti da questi organi. Per quanto riguarda le enteroparassitosi, le coccidiosi rappresentano la infestazione più comune, in tutti i casi associate a enterocolite catarrale cronica, con emorragie diffuse. *Fasciola hepatica* è un reperto raro e nel nostro caso associato a colecistite emorragica e lieve colangioepatite. I casi di passalurosi e teniasi (fam. Anoplocephalidae), sono stati reperti occasionali e mai associati a gravi processi flogistici intestinali da ricondurre a *causa mortis*.

DISCUSSIONE - L'indagine condotta a partire dal 2006 ha evidenziato la presenza di focolai di *Yersinia pseudotubercolosis* in Provincia di Firenze*:* la malattia è diffusiva, oltre che per i lagomorfi, anche per gli uccelli ed i rettili e può inoltre interessare specie allevate estensivamente (come suini Cinta Senese). La malattia è una zoonosi e il contagio per l'uomo è sia di tipo diretto (specie di interesse venatorio), che dovuto ad ingestione di acque o alimenti contaminati da feci. E' pertanto importante effettuare una ricerca sistematica di questo patogeno sia sugli animali trovati morti che sui selvatici destinati al ripopolamento. Questo accertamento richiede risorse economiche ed umane limitate ed è particolarmente importante per la sorveglianza epidemiologica del territorio, nonché per il controllo di patologie a carattere zoonotico. Nonostante la bassa prevalenza riscontrata, per le pratiche di ripopolamento che prevedono catture e trasporto in altre zone, è particolarmente importante sottoporre ad analisi gli animali al fine di contenere la diffusione del contagio.

La diffusione di *Y. pseudotuberculosis* sembra infatti essere favorita, oltre che da fattori ambientali come clima e territorio, anche da fattori stressanti come la cattura stessa o concomitanti infezioni e parassitosi (1). Il monitoraggio sanitario dovrebbe essere esteso anche al virus dell'EBHS, avvalendosi anche di esami sierologici; la bassa prevalenza osservata nelle province oggetto dell'indagine è senz'altro legata all' abolizione delle pratiche di ripopolamento con lepri provenienti dall'estero. Sono senz'altro di rilievo i dati di prevalenza di parassitosi abbastanza modeste e raramente riconducibili a causa di morte (coccidiosi intestinali massive).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI -

1) Ariano, F., Paladini, I., Piazza, A., Mangani, S., Trotta, G., Corrias, F., Belli, A., Filindri, U., Brajon, G. (2007). Isolamenti di Yersinia pseudotubercolosis in provincia di Firenze. Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria. Abano Terme 13-14 Settembre 2007.
2) Niskanen, T., Waldestrom, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Olsen, B., Korceala, H. (2003). virF-Positive Yersinia pseudotubercolosis and Yersinia enterocolitica found in migratory birds in Sweden. (2003). Applied and Environmental Microbiology, vol. 69, 4670-4675.
3) Otuka, Y., Okada, Y., Makini, S. e coll. Isolation of Yersinia pseudotubercolosis from city-living crows captured in a zoo. (1994). J.Vet.Med.Sci. vol. 56, 785-786.
4) Paci, G., Bagliacca, M., Fronte, B., Lavazza, A., (2004). Stress evaluation in Hares (*Lepus europaeus,* Pallas, 1778) captured for traslocation and monitored for European Brown Hare Syndrome. 2nd World Lagomorph Conference – Vairao, Portugal July 26-31 2004.
5) Paci, G., Bagliacca, M., (2003). La lepre e l'ambiente agricolo. Large Animals Review, Anno 9, n.2, Aprile 2003.

SUMMARY – A study about the health status and *causa mortis* of Brown Hare death in the province of Firenze, Prato and Pistoia (Tuscany) was performed. Necropsy findings have been ascribed to yersiniosis (5), streptococcosis (2), pasteurellosis (5), *bordetella bronchiseptica* (3) and European Brown Hare Sindrome (EBHS) (1). Copro-microscopical analysis were also performed, showing mild infestations. 12 case out of 58 were identified as traumatic death. The results are strongly important concerning environmental and health evaluation in capture and translocation of hares.

CYATHOSTOMA BRONCHIALIS IN OCHE DI STEINBACH

Luppi A., Maioli G., Spaggiari B., Gelmetti D., Gibelli L.R., Bonilauri P., Dottori M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

Key words: *Cyathostoma* sp., goose, diagnosis

ABSTRACT
The gapeworms are small nematodes worms that live in the respiratory tract of some birds. Gapeworms may cause disease in several birds, but are particularly important in pheasants, range-reared turkeys, geese and waterfowl. The gapeworm *Cyathostoma bronchialis* is a round red worm that attach to the trachea of birds and causes the disease referred to as "gapes". The term describes the open-mouth breathing characteristic of gapeworm-infected birds. *C. bronchialis* appear bright red sometimes in a Y configuration (the smaller male is attached to the larger female). An excess of mucus occurs as a result of irritation of the tracheal lining. Heavily infected birds usually emit a grunting sound because of the difficulty in breathing and many die from suffocation. The worms can easily block the trachea and bronchi, so they are particularly harmful to young birds. Aim of this paper is to present a case of disease by tracheal worms in eight two months old Steinbach geese.

INTRODUZIONE
Con il termine anglosassone di "gapeworm" si identificano piccoli nematodi che parassitano l'apparato respiratorio di numerosi uccelli. L'infestazione causata da questi nematodi assume particolare importanza nel fagiano ed in numerose specie aviarie ornamentali come anatre ed oche. Si conoscono due principali specie: *Syngamus trachea*, riconosciuto come causa di malattia soprattutto nei gallinacei (fagiano e tacchino) e parassiti appartenenti al genere *Cyathostoma*, che sono in grado d'infestare una grande varietà di volatili, tra cui oche, anatre, cigni e gabbiani (5).
Cyathostoma bronchialis, in particolare, è un nematode appartenente all'ordine *Strongilida*, famiglia *Syngamidae*, genere *Cyathostoma*, in grado di parassitare diverse specie di palmipedi (4). Il maschio misura 8-12 millimetri mentre la femmina misura dai 20 ai 30 millimetri (1).
Le caratteristiche principali di questo nematode sono la localizzazione degli esemplari adulti a livello di trachea, biforcazione tracheale ed alveoli polmonari. *C. bronchialis,* contrariamente a *S. trachea,* non vive in copula permanente ed il maschio può essere separato dalla femmina senza lacerarne i tegumenti.
C. bronchialis presenta un ciclo biologico indiretto, nel quale vengono coinvolti ospiti intercalari invertebrati quali molluschi terrestri (*Deroceras, Helicella, Lymnae*), lombrichi e millepiedi, così come le larve di *Musca domestica* e *Lucilia sericata* che si infestano ingerendo le uova del parassita. Dopo l'ingestione le uova schiudono generando le larve che si incistano nei tessuti dell'ospite paratenico. L'ospite definitivo si infesta nutrendosi di quest'ultimo e le larve del parassita passano dall'apparato digerente al torrente circolatorio, raggiungono i sacchi aerei dai quali risalgono ai bronchi ed alla trachea. Dopo circa 6 giorni le larve nutrendosi di sangue, raggiungono lo stadio di adulti. In questi distretti avviene la riproduzione e la produzione di uova, che vengono successivamente deglutite dagli uccelli infestati ed eliminate nell'ambiente esterno con le feci.
Sperimentalmente è stata dimostrata la trasmissione diretta di *C. bronchialis* attraverso l'ingestione da parte delle specie sensibili di uova embrionate o di larve già emerse dall'uovo.
I parassiti, anche se in numero limitato possono provocare gravi disturbi respiratori, soprattutto in animali di età inferiore ai due mesi, con sintomatologia caratterizzata da tosse, rantoli, dimagramento e talvolta morte per asfissia (2).
Nel presente lavoro viene riportato un caso di infestazione da *C. bronchialis* in otto Oche Combattenti di Steinbach allevate in un allevamento rurale in provincia di Reggio Emilia.

MATERIALI E METODI
Presso il laboratorio di diagnostica generale della Sezione di Reggio Emilia dell'IZSLER sono pervenuti tre esemplari di Oca Steinbach di 2 mesi d'età, di un effettivo di 8 capi tutti deceduti con anamnesi di patologia respiratoria caratterizzata da rantoli e respirazione a becco aperto.
Gli animali sono stati sottoposti ad esame necroscopico impiegando una procedura standardizzata. Durante la necroscopia sono stati prelevati il fegato e la milza per l'esecuzione di indagini batteriologiche di routine.
Campioni tessutali di polmone, trachea, cuore, fegato e milza sono stati prelevati, fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, secondo le procedure in uso e sezioni di 5 µm sono state colorate con ematossilina-eosina. Sempre durante la necroscopia sono stati eseguiti diversi campionamenti tramite raschiamento della mucosa intestinale per l'esecuzione di un'indagine parassitologica a "fresco".

Figura 1: Oca di Steinbach sottoposta ad esame necroscopico. Presenza di numerosi esemplari di *C. bronchialis* a livello della biforcazione tracheale e dei bronchi.

RISULTATI
Esame necroscopico: L'esame anatomopatologico ha evidenziato un moderato dimagramento dei soggetti ed uno stato congestizio di tutti gli organi della cavità splancnica. A livello polmonare si osservavano quadri più o meno marcati di aerosacculite acuta, diffusa ad entrambi i sacchi aerei.
La mucosa della trachea e dei bronchi si presentava congesta e ricoperta da un essudato mucoso siero-emorragico, nel quale erano immersi numerosi esemplari di vermi tondi, spesso raggomitolati.
Non sono state rilevate lesioni degne di nota negli altri organi ed apparati esaminati.
Esame parassitologico: I parassiti prelevati durante

l'esame necroscopico sono stati prima lavati in soluzione fisiologica, osservati allo stereo-microscopio e identificati secondo i criteri forniti da Euzeby nel 1963.
L'esame parassitologico eseguito sui raschiati intestinali ha evidenziato la presenza di numerose uova con opercolo ai due poli.

Figura 2: Esemplare maschio ed esemplare femmina di *C. bronchialis* in copula.

Esame istologico: Il polmone si presentava congesto, con emorragie multifocali ed iperplasia del BALT (Bronchial-associated lymphoid tissue). L'epitelio di rivestimento della trachea e dei bronchi primari, mostrava necrosi da miliari a confluenti, era altresì osservabile un essudato contenente detriti cellulari frammisti a granulociti eterofili e globuli rossi. Nel lume bronchiale e tracheale si reperivano parassiti liberi nel lume, isolati o raccolti in piccoli gruppi, la cui morfologia era assimilabile a nematodi (Foto 3). Le sezioni di cuore, fegato e milza non mostravano reperti di rilievo.
Esame batteriologico:
Le indagini eseguite tramite esame batteriologico sono risultate negative.

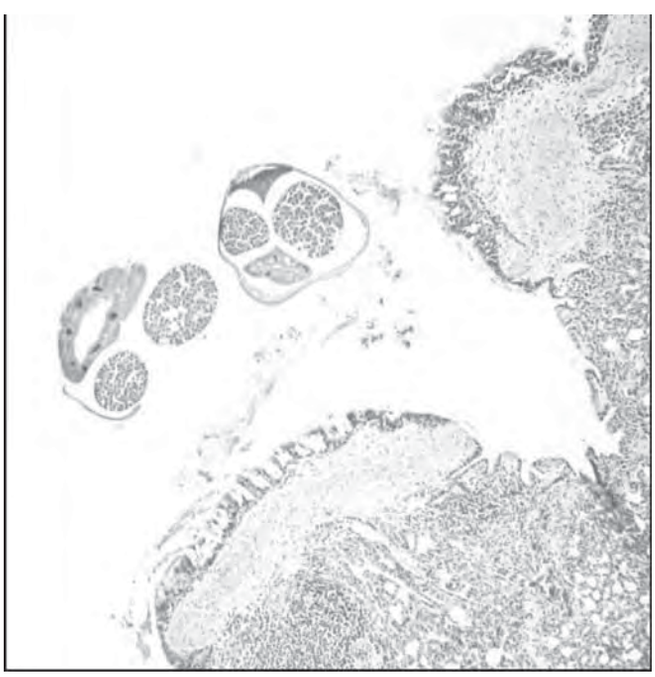


Figura 3: Sezione istologica di polmone. Parassiti liberi nel lume bronchiale. Ematossilina-eosina, piccolo ingrandimento.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
L'infestazione da *C. bronchialis* non costituisce una forma patologica di grande interesse per gli allevamenti di tipo industriale, rappresenta tuttavia, considerata l'elevata letalità, una importante malattia per i numerosi allevatori di specie ornamentali, spesso in possesso di animali di grande valore sia economico sia faunistico. La diagnosi è piuttosto agevole sia sulla base della caratteristica sintomatologia sia attraverso l'osservazione dei parassiti a livello dell'albero respiratorio di animali parassitati. Oltre all'osservazione dei parassiti in sede necroscopica, per poter eseguire la diagnosi intra-vitam, viene suggerito il metodo di evidenziazione dei parassiti attraverso trans-illuminazione della trachea, impiegando una sorgente luminosa piuttosto potente in modo da poter osservare dall'esterno, i parassiti localizzati all'interno della trachea (3)
Sempre per l'esecuzione della diagnosi nell'animale in vita, può essere importante l'esame parassitologico sulle feci, che permette di evidenziare uova opercolate che tuttavia devono essere differenziate da quelle di *Capillaria spp.*
Alcuni autori consigliano anche l'esecuzione di indagini ematologiche, sia a scopo diagnostico sia come monitoraggio dei casi clinici durante e dopo il trattamento terapeutico. I risultati che si ottengono in animali sintomatologici evidenziano un incremento, talvolta consistente, dei granulociti eosinofili e basofili (3).
La diagnosi tempestiva è fondamentale per poter approntare un'adeguata terapia negli animali ammalati e trattamenti preventivi nei soggetti non ancora infestati. Nel primo caso, la terapia, che generalmente viene praticata con l'impiego di presidi come l'ivermectina, deve essere valutata attentamente in quanto molti animali possono morire in seguito al trattamento stesso. Infatti, l'intervento terapeutico, in grado di uccidere i parassiti adulti nei soggetti infestati, porta con molta probabilità, a morte per soffocamento gli animali stessi. Per soggetti di particolare valore viene consigliata la rimozione manuale dei parassiti attraverso la via endoscopica o tramite un intervento di tracheotomia. In questi casi, a causa della tenace adesione dei parassiti alla mucosa tracheo-bronchiale, la loro rimozione può causare microscopiche lesioni e viene pertanto consigliata anche una terapia antibiotica per contrastare eventuali infezioni secondarie (3).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
1. Euzeby J.1963 "Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine"; Vigot Fr.s Editeur; Paris.
2. Fernando M.A., Hoover I.J., Ogungbade S.C. 1973. The migration and development of Cyathostoma bronchialis in geese. Journal of parasitology. 59: 5, 759-764.
3. Rosskopf W.J., Woerpel R.W. 1996 Respiratory parasites. In Diseases of cage and aviary birds, third edition. Chapter 47B, pp. 621-622.
4. Soulsby E.J.L. 1982. Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals, seventh edition. 197-198
5. Zieris H., Betke P. 1991. *Cyathostoma bronchialis* as a cause of death in mandarin ducks (*Aix galericulata*). Monatshefte fur Vetrinarmedizin. 46: 4, 146-149. 18 ref.

DIAGNOSI DI TOXOPLASMOSI IN LEPRE BRUNA EUROPEA (*Lepus europaeus*)

Luppi A.[1], Fontana M.C.[1], Galletti E.[1], Spaggiari B.[1], Maioli G.[1], Bonilauri P.[1], Dottori M.[1], Trocchi V.[2], Merialdi G.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

[2] Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Ozzano Emilia – Bologna

Key Words: *Toxoplasma gondii* – European brown hare – diagnosis

ABSTRACT

Six cases of fatal acute toxoplasmosis were observed in hares in different areas of Emilia Romagna region during a period of 4 months. The most characteristic lesion in all hares was a severe splenomegaly. Toxoplasmosis was diagnosed through cytological examination of spleen imprint sampled slides and confirmed by PCR in all hares. Hares should be considered exceptionally susceptible to primary *Toxoplasma gondii* infection. Epidemiology and prevalence of *T. gondii* in hares in Northern Italy needs further investigations. The monitoring of the disease in hares could be used to evaluate the level of environmental oocysts contamination in specific geographic areas.

INTRODUZIONE

Il protozoo *Toxoplasma gondii* è diffuso in tutto il mondo. I felini sono gli unici ospiti definitivi noti, capaci di disseminare attraverso le feci il parassita allo stadio di oocisti infettante, mentre la maggior parte dei mammiferi e degli uccelli sono potenziali ospiti intermedi. Le infezioni da *T. gondii* sono normalmente subcliniche o sono caratterizzate da lievi segni clinici sia negli ospiti definitivi sia in quelli intermedi. Ciononostante, infezioni acute disseminate ad esito letale sono normalmente presenti in alcune specie, come le scimmie, i lemuri, le lepri brune europee (*Lepus europaeus*) e le lepri artiche (*Lepus timidus*) (2).

La lepre bruna europea è un mammifero selvatico comune in Europa, dove viene regolarmente cacciata. La manipolazione ed il consumo di carne di lepri infette da *T. gondii* potrebbe rappresentare un rischio zoonotico per l'uomo.

La lepre è considerata una specie particolarmente suscettibile all'infezione primaria da *T. gondii,* con un'alta incidenza di toxoplasmosi acuta fatale ed una bassa prevalenza di infezioni latenti e subcliniche (3).

Lo scopo del presente lavoro è la segnalazione di diversi casi spontanei di toxoplasmosi fatale nella lepre, diagnosticati mediante l'impiego dell'esame citologico su strisci di milza e della *polymerase chain reaction* (PCR).

MATERIALI E METODI

Tra novembre 2008 e febbraio 2009 venticinque lepri brune europee, rinvenute morte in diverse aree dell'Emilia Romagna sono state recuperate ed inviate ai Laboratori IZSLER per evidenziarne la causa della morte. Tutte le lepri sono state sottoposte a necroscopia ed i relativi tessuti (fegato e milza) ad esame batteriologico utilizzando metodiche standardizzate.

Per la diagnosi di toxoplasmosi sono stati utilizzati i *primers* APIF (5' AAGTATAAGCTTTTATACGGC 3') e APIR (5' CACTGCCACGGTAGTCCAATAC 3').

Questi *primers* riconoscono un frammento di 280-325 bp del gene 18S che è conservato tra i diversi parassiti *Apicomplexa* appartenenti alla famiglia *Sarcocystidae*, inclusi *T. gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis* spp. I campioni positivi sono stati poi genotipizzati mediante metodica RFLP (*Restriction Fragment Lenght polymorphism*) utilizzando l'enzima BseDI.

Preparati citologici per impronta di sezioni di milza sono stati colorati con la colorazione Diff Quick ® e sono stati valutati al microscopio ottico.

Sono stati inoltre effettuate indagini di laboratorio per la ricerca del virus dell'*European Brown Hare Syndrome* (EBHSV) e di *Francisella tularensis*.

RISULTATI

In sede di necroscopia, in sei lepri è stata riscontrata una notevole splenomegalia associata a linfoadenomegalia dei linfonodi mesenterici (fig. 1). In 3 animali sono stati inoltre osservati foci di necrosi delle dimensioni di 1-2 mm distribuiti a livello del parenchima splenico ed epatico.

Fig. 1 – Fegato e milza di lepre colpita da toxoplasmosi.

Marcata splenomegalia.

Le indagini batteriologiche eseguite sui tessuti prelevati durante la necroscopia non hanno dimostrato la presenza di batteri patogeni nelle sei lepri sopraccitate.

L'esame citologico eseguito su impronte di sezioni spleniche ha evidenziato in tutti i casi un abbondante quantità di materiale necrotico, frammisto al quale si potevano osservare numerosi tachizoiti liberi o contenuti all'interno di cellule macrofagiche (fig. 2).

La diagnosi citologica di toxoplasmosi è stata confermata con l'impiego della PCR, che ha dimostrato la presenza di *T. gondii* nel parenchima splenico in tutte sei le lepri esaminate.

Le indagini eseguite per la ricerca del virus dell'EBHS e di *F. tularensis*, rispettivamente con l'impiego di un test ELISA e di una metodica PCR, hanno dato esito negativo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dal punto di vista diagnostico, l'esame citologico si è dimostrato rapido ed economico, altamente sensibile e specifico nella diagnosi di toxoplasmosi acuta nella lepre.

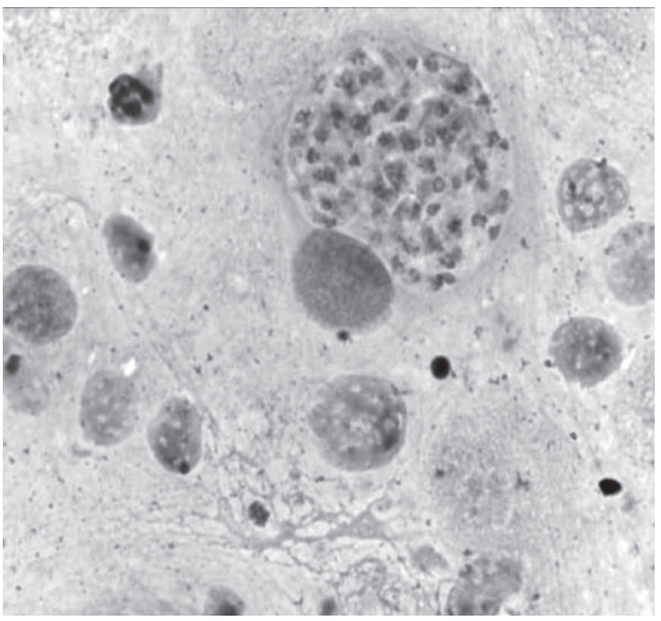


Fig. 2 – Esame citologico per impronta della milza. Cellula macrofagica contenente numerosi tachizoiti. Diff Quick ®*, 100X*

Andando a considerare il caso in esame è possibile eseguire alcune valutazioni di tipo epidemiologico.
Nel determinare la gravità delle forme di toxoplasmosi gioca un ruolo importante la suscettibilità dell'ospite, la virulenza del parassita e la dose infettante. La toxoplasmosi nella lepre è frequentemente associata a malattia grave e mortale e prove d'infezione sperimentale hanno dimostrato una maggiore suscettibilità delle lepri rispetto ai conigli (2). Nonostante questo esistono dati che confermano l'esistenza di forme sub-cliniche anche nella lepre, come si osserva da uno studio eseguito in Germania, in cui il 46% delle lepri presentava anticorpi nei confronti di *T.gondii* (1).
T. gondii può essere trasmesso attraverso tre modalità: per via transplacentare, attraverso l'ingestione di carne in cui sono presenti le cisti parassitarie o attraverso l'ingestione delle oocisti tramite un ciclo oro-fecale. La principale via d'infezione per gli animali erbivori è probabilmente attraverso l'ingestione di oocisti che contaminano il terreno ed i foraggi. Le oocisti sporulate presenti nelle feci di gatto possono rimanere vitali nel terreno per periodi anche superiori ad un anno in presenza di condizioni favorevoli. Le oocisti sono inattivate dopo un certo periodo di tempo, se sottoposte ad essiccamento, esposizione diretta ai raggi del sole e a cicli di congelamento e scongelamento. La sopravvivenza delle oocisti è influenzata da fattori ambientali, portando la toxoplasmosi ad avere un carattere stagionale. I casi acuti di toxoplasmosi osservati e descritti nel presente lavoro sono probabilmente dovuti ad una elevata contaminazione ambientale. La valutazione della prevalenza dell'infezione da *T. gondii* nelle lepri può quindi essere impiegata come indicatore del livello di contaminazione ambientale da oocisti in determinate aree geografiche.
Ulteriori indagini sono necessarie per stabilire la presenza di anticorpi nei confronti di *T. gondii* nelle lepri, per valutare eventuali infezioni sub-cliniche in questa specie nel Nord Italia. Questo aspetto assumerebbe particolare importanza considerando che le lepri vengono regolarmente cacciate e impiegate nell'alimentazione dell'uomo, potendo rappresentare una potenziale fonte d'infezione per quest'ultimo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Frölich K, Wisser J., Schmüser H., Fehlberg U., Neubauer H., Grunow R, Nikolaou K, Priemer J., Thiede S., Streich W.J., Speck S., 2003. Epizootiologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. J Wildl Dis, 39 (4):751–761.
2. Gustafsson K, Uggla A, Jarplid B, 1997. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). I. Pathology. J Comp Pathol, 117:351-360.
3. Sedlák K., Literák I., Faldyna M., Toman M., Benák J, 2000. Fatal toxoplasmosis in brown hares (*Lepus europaeus*): possible reasons of their high susceptibility to the infection. Vet Parasitol 93:13-28

ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI BATTERI NEL LATTE DI CAPRE ALLEVATE IN SARDEGNA

Marogna G., Pilo C., Vidili A., Bandino E.,Tola S., Schianchi G., Leori S.G.
Centro di Referenza Nazionale per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini – IZS della Sardegna "G. Pegreffi"

Parole chiave: epidemiologia, mastite, infezione

SUMMARY
Most important bacterial species involved in goat mastitis in Sardinia were isolated and identified by standard microbiological techniques. Results show some similarities and some differences vis a vis of similar survey carry out in sheep breedings in Sardinia. The most representative isolated bacterial species have been Coagulase Negative Staphylococci (CNS), in particular *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus caprae*.

INTRODUZIONE

La Sardegna è una delle Regioni italiane dove più intenso è l'allevamento della capra; caratteristica dell'allevamento caprino sardo è l'indirizzo verso la produzione di latte da destinare alla trasformazione. Recentemente nuovo impulso produttivo è stato determinato dall'aumento della domanda per il latte caprino destinato al consumo diretto. Sebbene questa spinta produttiva non abbia determinato quelle profonde trasformazioni del management aziendale registrate nell'allevamento della pecora da latte, anche l'allevamento caprino ha subito in questi ultimi anni una certa modernizzazione. Ne consegue che convivono nell'isola pratiche di allevamento apparentemente "ancestrali", che prevedono il pascolamento brado di vaste superfici cd marginali, carenti nell'innovazione zootecnica, con realtà di allevamento altamente tecnologiche e paragonabili con quelle dei moderni allevamenti degli ovini e dei bovini. Pochi sono i lavori riportati in letteratura sulle mastopatie dei caprini, tuttavia su alcuni di questi (1-2-3), si fa chiaro riferimento ad episodi causati dall'infezione di alcune specie di stafilococchi coagulasi negativi (SCN) e di streptococchi. Questa evidenza porterebbe al paragone con l'allevamento ovino, nel quale la maggior parte delle infezioni mammarie diagnosticate negli ultimi anni sarebbe in gran parte da attribuirsi a microrganismi c.d. ambientali ed opportunisti come appunto gli stafilococchi coagulasi negativi e gli streptococchi. Le perdite dirette ed indirette (peraltro mai organicamente stimate) causate da alcuni di questi germi sembrerebbero ingenti e aggravate dal fatto che queste forme, quasi sempre clinicamente poco evidenti, sono di difficile identificazione. Obiettivo principale del lavoro è stato quello di determinare la prevalenze delle mastiti in allevamenti caprini sardi "problema" e di isolare attraverso metodiche colturali tradizionali le principali specie batteriche responsabili. Questa azione preliminare fa parte di un progetto più ampio sullo studio delle mastiti batteriche nei caprini sardi finanziato dal Ministero della Salute al Centro di Referenza Nazionale per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini, tuttora in corso d'opera.

MATERIALI E METODI

Per definire il nostro campione ci si è avvalsi delle banche dati del laboratorio latte dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS) che esegue mensilmente conte delle cellule somatiche sul latte di massa di circa il 90% degli allevamenti isolani. Sono stati selezionati per essere inclusi nella sperimentazione 31 allevamenti problema, distribuiti su tutto il territorio isolano, rispondenti ai seguenti requisiti: un valore di cellule somatiche (SCC), nel latte di massa, sempre superiore ai $5x10^6$/ml rilevato in almeno 5 analisi distribuite nell'arco di due anni (2005-2006); persistenza del problema sanitario; disponibilità a collaborare dell'allevatore. Le visite cliniche ed i prelievi di latte sono state eseguite nel periodo di piena lattazione fra gennaio e aprile 2007 ed hanno riguardato l'intero effettivo in lattazione presente in azienda al momento della visita. In totale sono stati visitati e sottoposti a prelievi 1388 capi appartenenti a diverse razze ed incroci. I prelievi di latte sono stati eseguiti dopo pulizia del capezzolo con Alcool etilico 90° denaturato ed eliminazione dei primi getti; il latte veniva campionato (non meno di 5 ml) mungendolo all'interno di un contenitore sterile. Il latte non è stato differenziato per emimammella, ma ogni campione costituiva una miscela delle due secrezioni. Il campione raccolto veniva prontamente refrigerato e sottoposto ad esame batteriologico entro 24 ore. L'esame colturale prevedeva l'inoculo di 10 µl di latte in piastre di agar-sangue di montone al 5%, incubate a 37 ± 1 °C per 24-48h. Sulle piastre positive alla crescita, si procedeva all'isolamento di una colonia per le identificazioni di tipo fenotipico. Quando su uno stesso campione cresceva più di un fenotipo, questo veniva catalogato come "flora microbica varia" e non si procedeva ad ulteriori identificazioni. In caso di crescita di un unico fenotipo si procedeva alla identificazione di specie mediante colorazione di Gram e i test della coagulasi e della catalasi. Nel caso di colonie attribuibili ai generi *Staphylococcus*, *Streptococcus* ed *Enterococcus* si completava l'identificazione utilizzando test biochimici multipli (API, bioMérieux) e i profili ottenuti venivano interpretati con il sistema api*web*® (bioMérieux). Successivamente, anche per ovviare alle difficoltà interpretative che spesso si incontrano nell'identificazione di ceppi microbici di provenienza animale (il sistema API nasce per i germi di origine umana) sono state prese in considerazione nuove e ulteriori caratteristiche fenotipiche della batteriologia "classica": emolisi in agar sangue di montone al 5%, crescita e fermentazione in terreno Mannitol Salt Agar (MSA), produzione di coagulasi "libera" (BBL Coagulase Plasma Rabbit con EDTA, BD) e di "clumping factor" (Staphylase Test, Oxoid). Sono state anche saggiate crescita e reazioni in terreno Baird-Parker RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) Agar (Microbiol).

RISULTATI

I risultati sono riassunti in quattro grafici a calce.

DISCUSSIONE

Come già osservato in analoghe indagini condotte sull'ovino (4), anche nell'allevamento del caprino da latte si osserva un incremento delle identificazioni di germi ambientali ed opportunisti. In particolare è interessante evidenziare come lo S*taphylococcus epidermidis* (SCN) sia stato il batterio più isolato. A differenza dell'ovino si osserva un aumento dell'incidenza di infezioni da parte di *Staphylococcus caprae* (17,4 %) e *Staphylococcus hyicus* (9,3 %), che quindi mostrerebbero maggiore specificità per la specie caprina. Fra gli streptococchi spicca l'identificazione di *Streptococcus uberis* (63,9 % degli streptococchi) in un contesto nel quale, tuttavia, le infezioni causate da questa famiglia (9% del totale) appaiono più contenute rispetto a quanto osservato in analoghe indagini sull'ovino (4). Ulteriore dato distintivo è dato dall'isolamento di *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus disgalactiae,* mai identificati nella ricerca epidemiologica eseguita sugli ovini (4).

BIBLIOGRAFIA

1. Moroni P. et al. – 2005 – Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian goats – in: Preventive Veterinary Medicine;
2. Haenlein G.F.W. – 2002 – Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity – in: Small Ruminant Research;
3. White E.C. and Hinckley L.S. – 1999 – Prevalence of mastitis pathogens in goat milk – in: Small Ruminant Research.
4. Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. - Quadri clinici in allevamenti ovini con gravi problemi di mastopatie infettive – Tavola Rotonda: in Atti XVIII Congresso Nazionale SIPAOC, Villa Cavenago, Trezzo sull'Adda (MI) 17 – 20 settembre 2008.

Finanziamento. Questo lavoro è inserito all'interno di un progetto di ricerca corrente ministeriale dal titolo "Le principali mastopatie ad eziologia batterica nei caprini della Sardegna" IZS SA 01/05 RC.

Ringraziamenti. Sig.ri Fiori A., Farina F., Auzzas S. e Sig.ra Barbato A., per la costante disponibilità e dedizione al lavoro.

Grafico 1

Grafico 2

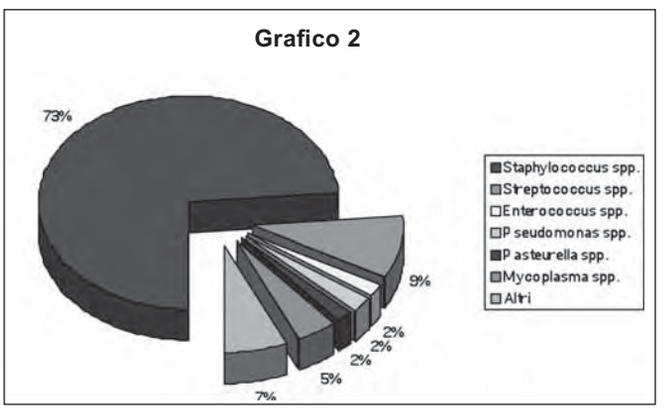


Grafico 3

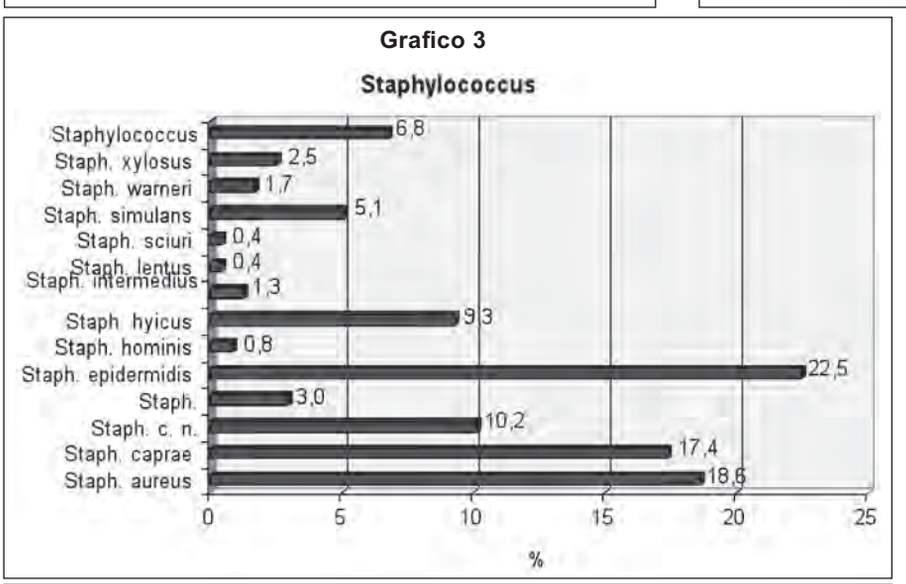
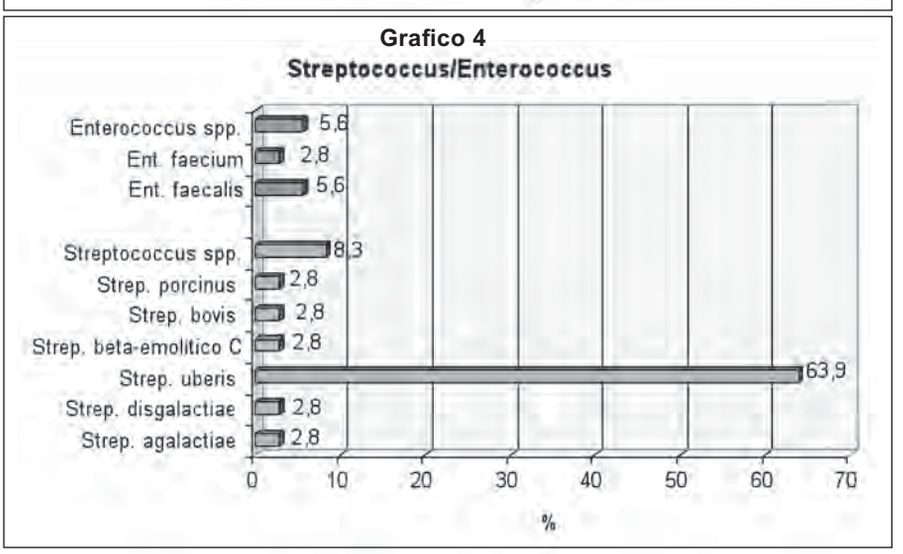


Grafico 4



UTILIZZO DI BIOPSIE MAMMARIE NELL'OVINO DI RAZZA SARDA

Marogna G., Pilo C., Schianchi G., Leori S.G.
Centro di Referenza Nazionale per le Mastopatie degli Ovini e dei Caprini – IZS della Sardegna "G. Pegreffi"

Parole chiave: noduli, mastite, infezione

ABSTRACT

We describe a technique of a tissue sampling in 22 Sarda breed milking sheep udder. General and specific clinical sign of sampled sheep has been monitored during several days. None of general clinical sign has been observed, and in 18 out of 22 sheep no reaction has been shown in the udder. One of the sampled sheep showed pus in the sampled nodule, so recovery has been delayed; 3 sheep showed blood traces in the milk during two days, among this two developed a progressive half udder sclerosis. Tissue sampling could help in diagnostic and genetic research purposes in live animals.

Introduzione

Con il termine biopsia si intende il prelievo di un frammento di tessuto a scopo di analisi. Si tratta di un esame eseguito su animali vivi che, benché venga considerato poco doloroso, avviene generalmente in anestesia locale, sia per il rispetto delle norme sul benessere animale che per garantire una adeguata contenzione dello stesso e quindi una maggiore precisione nel prelievo. Il tessuto prelevato viene successivamente inviato al laboratorio per le analisi desiderate (esami istologici, diagnosi colturali, estrazione di DNA o RNA ecc.). Mentre in campo umano l'utilizzo di detta tecnica è comune, in ambito veterinario la metodica è utilizzata quasi esclusivamente nel settore della clinica e chirurgia degli animali da affezione (cane e gatto) e, solo occasionalmente, in quelli da reddito. Conseguentemente sono rari i lavori che descrivano tecniche di prelievo bioptico nei ruminanti, e più in particolare noi non abbiamo trovato alcun riferimento sull'utilizzo di questa tecnica per prelievi di tessuto mammario negli ovini. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di testare una tecnica di prelievo bioptico su mammella in ovini in piena lattazione e monitorare il post operatorio per verificare l'eventuale sviluppo di reazioni indesiderate.

Materiali e Metodi

Le prove sono state eseguite in tempi diversi su pecore di razza Sarda appartenenti a due greggi differenti. Il primo (gregge A) costituito da 152 pecore era caratterizzato dalla presenza di numerosi soggetti nei quali si rilevavano noduli all'esame clinico della mammella (15 % dei capi). I noduli variavano per numero (normalmente da 1 a 5) e dimensioni (da quelle di un pisello a quelle di una noce). Gli esami colturali effettuati dal latte individuale di un campione rappresentativo del gregge (32 capi) evidenziavano positività per *Staphylococcus aureus* (10 positivi e 22 negativi). E' importante rilevare come in alcuni capi (12) con noduli e sclerosi del parenchima, il batteriologico è comunque risultato negativo. L'impossibilità di diagnosticare dal latte l'agente eziologico ci ha portato all'utilizzo della tecnica bioptica nel tentativo di isolare direttamente dai frustoli dei noduli l'eventuale presenza di batteri. Nel dettaglio l'esame è stato eseguito su due ovini di circa 7 anni d'età, relativamente magri (BCS 2,25 corrispondente per la razza Sarda alla definizione di "pecora magra"), soggetti caratterizzati dalla presenza di diversi noduli mammari, alcuni dei quali superficiali (sottocutanei), visibili ad occhio nudo e facilmente aggredibili con prelievo bioptico. Il secondo gregge (gregge B) era costituito da un nucleo di 20 animali destinati a studi di genetica, che prevedevano l'estrazione dai frustoli di parenchima dell'RNA totale, poi utilizzato per studi di espressione genica. Tutti gli animali del gregge B avevano età compresa fra i 4 e i 5 anni, buono stato di nutrizione (BCS medio 2,75) e all'esame clinico generale apparivano in buona salute. Particolare attenzione si poneva all'esame ispettivo della mammella che non presentava segni di patologie in corso o pregresse. Su tutti gli animali esaminati (greggi A e B), il prelievo bioptico veniva eseguito un'unica volta, sempre da una sola emimammella. Le pecore venivano adagiate in decubito dorsale e quindi contenute manualmente da uno o due aiutanti. A questo punto la mammella veniva lavata con acqua e sapone, asciugata e se del caso rasata nella zona del prelievo. Si procedeva quindi ad una anestesia locale inoculando 5 ml di lidocaina al 2% (Fort Dodge Animal Healt Spa). Di seguito si eseguiva la disinfezione dell'area con polivinilpirrolidone-iodio (Betadine® chirurgico, Meda Pharma). Dopo circa 3-5 minuti dall'anestesia si eseguiva una piccola incisione di 1-2 cm e a questo punto si inseriva il trocar sterile. Mentre sui noduli (gregge A) era sufficiente inserire il trocar per pochi cm all'interno della lesione, per quanto concerne i prelievi di parenchima sano (gregge B), il trocar veniva affondato nel parenchima per quasi tutta la lunghezza utile (circa 8 cm). Per i nostri prelievi abbiamo utilizzato aghi da biopsia sterili con le seguenti misure: G 9 × 100 mm (cod. CLA 1108, Angelo Franceschini Srl). Una volta raggiunta la profondità desiderata si effettuavano delle rotazioni in senso orario e antiorario in modo che le lame all'apice dell'attrezzo potessero sezionare la base del carotaggio e quindi consentire il recupero del frustolo. Il frustolo veniva prontamente recuperato dentro una provetta sterile (Falcon® in polypropylene da 15 ml) inserendo un mandrino all'interno del trocar. Si procedeva quindi a chiudere l'incisione con un punto graffetta metallico e si disinfettava l'area con uno spray antibiotico (Terramicina spray®, Pfizer Italia). Subito dopo l'intervento ogni animale veniva inoculato intramuscolo con ossitetraciclina ritardo (Terramicina L.A®. , Pfizer Italia). Tutti gli animali prelevati sono stati monitorati per il rilievo di eventuali reazioni indesiderate. Dal giorno 0 al giorno 7 si eseguiva quotidianamente una visita clinica generale (comprensiva del rilievo della temperatura rettale) e l'ispezione della mammella, intesa come esame della ferita e dello stato generale dell'emimammella interessata. Poiché tutti gli animali erano in lattazione al momento del prelievo, si è esaminato (macroscopicamente) l'aspetto del secreto per 7 giorni. Il giorno 11 si procedeva all'asportazione delle graffette metalliche. Il giorno 20 ad una nuova visita generale e all'esame specifico della mammella. Per quanto concerne la prova del gregge A, i frustoli sono stati strisciati su piastre di agar-sangue di montone al 5%, incubate a 37 ± 1 °C per 24-48h. Sulle piastre positive alla crescita si procedeva all'isolamento di una colonia per le identificazioni di tipo fenotipico mediante colorazione di Gram e i test della coagulasi e della catalasi. Si completava l'identificazione utilizzando test biochimici multipli (API, bioMérieux) e i profili ottenuti venivano interpretati con il sistema api*web*® (bioMérieux). Per quanto concerne il gregge B era importante ai fini dell'estrazione del RNA totale ottenere campioni di parenchima di peso non inferiore ai 15 mg.

Risultati

I frustoli prelevati hanno pesato fra i 18 e i 20 mg. La manualità richiesta per i prelievi non ha comportato difficoltà ed è risultata di semplice esecuzione. Tutto l'intervento sull'animale: cattura, contenimento, pulizia, disinfezione, anestesia locale, incisione, prelievo, punti e somministrazione di antibiotici per via generale richiedeva non più di 10 minuti per capo. I controlli effettuati hanno mostrato come nessun capo abbia manifestato segni clinici generali a seguito dell'intervento e le temperature rettali siano rientrate nei limiti fisiologici (38-39 °C). Per quanto concerne i segni relativi all'esame della mammella in 18 dei 22 capi sottoposti a biopsia non sono mai stati evidenziati segni indesiderati conseguenti alla procedura applicata. Invece, in un soggetto del gregge A, l'introduzione del trocar ha comportato la fuoriuscita di materiale purulento dal nodulo, in questo animale non si è applicato il punto metallico in modo da consentire il drenaggio della ferita. In questo caso la cicatrizzazione è stata completata attorno al decimo giorno dall'intervento. Per quanto concerne i 20 capi del gregge B, 3 soggetti hanno mostrato per 2 giorni (quattro mungiture) tracce evidenti di sangue nel latte e due di questi hanno evidenziato progressiva sclerosi e un significativo calo della produzione della emimammella interessata all'intervento. I batteri isolati sono stati identificati come *Staphylococcus aureus*.

Discussione

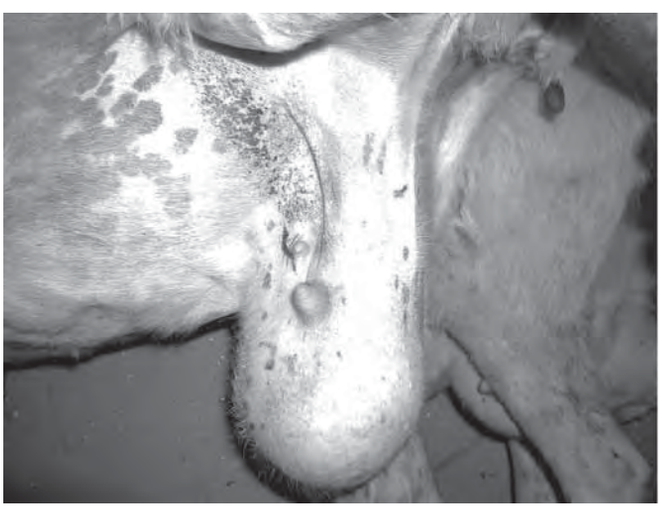
In generale l'utilizzo della biopsia si è rilevato un valido strumento sia per ovviare a specifiche problematiche diagnostiche che per le ricerche di genetica. Nel nostro caso non abbiamo utilizzato i frustoli per eseguire esami istologici ma la dimensione del prelievo è tale da far ritenere agevole l'applicazione di queste metodiche che, ricordiamo, possono essere eseguite sull'animale in vivo. Riteniamo importante sottolineare il risultato ottenuto con la diagnosi di *Staphylococcus aureus* dai noduli delle pecore negative all'esame colturale del latte (gregge A). L'esecuzione di analisi colturali su latte di ovini appartenenti a greggi con problemi di mastopatie infettive mette in evidenza, con percentuali variabili, il problema diagnostico legato ai soggetti che risultano negativi all'esame batteriologico nonostante gli evidenti segni clinici di mastite. I segni in questione sono prettamente di tipo cronico e sono essenzialmente rappresentati da sclerosi più o meno diffuse del parenchima e dal rilievo di noduli. L'evento potrebbe essere spiegato in vario modo, ed una delle ipotesi potrebbe essere la guarigione del soggetto, intesa come fine dell'infezione ossia come assenza dell'agente eziologico con concomitante presenza di reazioni cicatriziali permanenti, oppure con il confinamento di questo ultimo all'interno di tessuto di reazione. In questo secondo caso, invero non raro, la pratica della biopsia può risultare risolutiva, consentendo l'identificazione dell'agente eziologico anche in presenza di un colturale dal latte negativo. Esami di genetica a parte (che richiedono campioni di dimensioni relativamente importanti) riteniamo che la tecnica possa essere notevolmente migliorata perlomeno per l'utilizzo nella diagnostica microbiologica. In umana oggi vengono utilizzate tecniche di biopsia micro invasiva della mammella che utilizzano sottili aghi (tecnica dell'agoaspirato) di calibro tra i 21 e i 27 Gauge (quanto quelli normalmente in dotazione nelle siringhe da 2,5 – 5 ml). La manualità è sempre elementare e la tecnica non si discosta molto da quella da noi descritta. Riteniamo che in futuro, l'utilizzo della tecnica dell'agoaspirato possa eliminare completamente quei pochi casi di sclerosi e atrofia che abbiamo registrato nelle nostre prove.

Ringraziamenti. Sig.ri Farina F., Auzzas S. e Sig.ra Barbato A., per la costante disponibilità e dedizione al lavoro e al sig. Fiori Angelo per le immagini.

Foto 1 – anestesia locale

Foto 2 - prelievo

Foto 3 – a 11 giorni (eliminazione della graffetta)



MONITORAGGIO DELLA TRICHINOSI IN TOSCANA PER LA RICHIESTA DELLA QUALIFICA DI "REGIONE A BASSA PREVALENZA DI *Trichine*"

Martelli S.,[1] Mari M., Fico R., Stefanelli S., Corrias F., Brocherel G., Dal Prà A., Ragona G., Lombardo A., Piazza A., Paladini I., Leto A.,[1] Brajon G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

[1]Regione Toscana-Direzione Generale diritto alla salute e politiche di solidarietà. Settore Medicina Predittiva-Preventiva

Key words: Trichinosi, monitoraggio, prevalenza

INTRODUZIONE

Ai fini della prevenzione negli animali e nell'uomo della Trichinosi, la Commissione Europea ha emanato il regolamento (CE) n. 2075/2005 che stabilisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di *Trichine* nelle carni. L'allegato IV di detto regolamento offre, in particolare, la possibilità alle Regioni degli Stati Membri di ottenere la qualifica di "Regione a bassa prevalenza di *Trichine"*. I requisiti che le Regioni devono possedere per richiedere tale qualifica sono assenza di positività alla ricerca di *Trichine* durante la macellazione dei suini per un periodo di dieci anni ed attuazione di un piano di monitoraggio sulla fauna selvatica sensibile. In Toscana, nel periodo 1995-2005, non si è verificata alcuna positività per Trichine nei suini macellati (3), pertanto, al fine di ottenere la qualifica (5), è necessario attuare un piano di monitoraggio sulla fauna selvatica sensibile. Inoltre, per dimostrare l'assenza di contaminazioni autoctone da *Trichine* sul territorio regionale, come previsto dal regolamento comunitario (8), la Regione Toscana, avvalendosi della collaborazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, ha attuato non solo il piano di monitoraggio sulla fauna selvatica sensibile (cinghiali abbattuti a caccia, volpi e altri selvatici indicatori), ma anche un programma di monitoraggio sui suini macellati a domicilio per il consumo domestico privato delle carni. Obiettivo di questo elaborato è dunque dimostrare che in Regione Toscana, attraverso le strategie adottate, sono soddisfatti i requisiti previsti dal regolamento (CE) n. 2075/2005 necessari per ottenere la qualifica di "Regione a bassa prevalenza di *Trichine".*

MATERIALI E METODI

Specie animali sottoposte a controllo

Le specie animali sottoposte a controllo per la ricerca di *Trichine* sono state: suini allevati a domicilio e macellati per il consumo domestico privato delle carni, cinghiali abbattuti a caccia per il consumo domestico privato delle carni, volpi e altri animali indicatori cacciati o rinvenuti morti sul territorio regionale. Com'è noto Trichinella spp. instaura un ciclo silvestre e uno rurale, tali cicli si possono realizzare e mantenere indipendentemente l'uno dall'altro o intersecarsi, le categorie di animali scelte dunque sono indicatori significativi della circolazione del parassita sia in ambito silvestre (cinghiali, volpi e altri selvatici) che in ambito rurale (suini allevati a domicilio). Non tutti gli ospiti recettivi svolgono il ruolo di serbatoio per le quattro specie di Trichinella che circolano in Europa peraltro dotate di scarsa specificità parassitaria (*T. spiralis*, *T. britovi, T. nativa e T. pseudospiralis*) (7). Per questo motivo la scelta del campione è stata indirizzata a svelare soprattutto contaminazioni autoctone di *T. britovi* e *T. spiralis*. Infatti dal 1887 al 2006 in Regione Toscana si è verificato solamente un focolaio da *T. britovi* (Montevarchi del 1993) che ha coinvolto quattro persone. Le specie di Trichinella che potrebbero essere attualmente presenti sul territorio regionale sono dunque *T. britovi* e *T. spiralis*, presente in Italia ma mai isolata in Regione Toscana. Il suino allevato a domicilio e la volpe rossa (vulpes vilpes) risultano i migliori animali indicatori per svelare la presenza di *T. britovi* (7), mentre il cinghiale (Sus scrofa) è uno dei migliori indicatori per svelare la presenza di *T. spiralis e T. britovi* (7).

Prelievo campioni

Nell'ambito della macellazione del suino a domicilio per il consumo domestico privato delle carni sono stati prelevati, dai veterinari delle aziende USL, 50 gr. di tessuto muscolare dal pilastro del diaframma (zona di transizione tra la parte muscolare e tendinea) il più possibile esente da tessuto connettivo e grasso (1-2). Per i cinghiali è stato attuato un campionamento pari a 4 cinghiali adulti abbattuti per squadra di caccia/ stagione venatoria. Il prelievo, 150 grammi di tessuto muscolare dal pilastro del diaframma (zona di transizione tra la parte muscolare e tendinea) il più possibile esenti da tessuto connettivo e grasso, è stato effettuato dai capi squadra previamente addestrati. Per quanto riguarda le volpi e altri selvatici sensibili i prelievi sono stati effettuati direttamente dai Servizi Veterinari delle Aziende USL.

I campioni sono stati inviati alle sezioni toscane dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana per la ricerca di *Trichine* accompagnati da apposito verbale di campionamento (1).

Metodi diagnostici utilizzati

Tutti i campioni prelevati sono stati esaminati dai laboratori delle sezioni toscane dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. Dal momento che la Regione Toscana ha escluso l'utilizzo del metodo trichinoscopico per compressione, in quanto non più idoneo come metodo di individuazione d'uso corrente, i campioni sono stati analizzati utilizzando la prova della digestione artificiale con agitatore magnetico (8).

Elaborazione statistica dei risultati

Per l'elaborazione statistica dei risultati l'Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale presso la Sezione di Siena dell'Istituto Zooprofilattico (O.E.V.R.) ha utilizzato il software Win Episcope calcolando la prevalenza massima possibile che è risultata essere dello 0,02% con un livello di confidenza al 99,5%.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi all'esame per la ricerca di *Trichine* (tabelle 1, 2, 3 e 4).

Tabella1: Numero di campioni di suini allevati e macellati a domicilio distribuiti su base provinciale

Provincia	Campagna 2006-2007	Campagna 2007-2008	Campagna 2008-2009	Tot
Arezzo	1114	917	1008	**3039**
Firenze	1655	2087	3711	**7453**
Grosseto	1478	1658	1487	**4623**
Livorno	301	569	540	**1410**
Lucca	228	498	1172	**1898**
Massa Carrara	1030	913	783	**2726**
Pisa	1492	1418	1106	**4016**
Prato	172	121	140	**433**
Pistoia	601	332	1077	**2010**
Siena	884	907	887	**2678**
TOTALE	**8.955**	**9.420**	**11.911**	**30.286**

Fonte: O.E.V.R.

Nell'ambito del monitoraggio delle specie selvatiche sono stati esaminati complessivamente 4.194 campioni (3.709 cinghiali e 485 altri selvatici) atti a svelare al 99,5% una prevalenza massima dell'evento morboso dello 0,13%. Importante sottolineare che, oltre ai 3.709 cinghiali esaminati, sono state analizzate 318 volpi su un totale di 485 prove effettuate su selvatici indicatori. (tabelle 2, 3 e 4)

Tabella 2: Numero di campioni di cinghiali abbattuti a caccia distribuiti su base provinciale

Provincia	Campagna 2007-2008	Campagna 2008-2009	Totale
Arezzo	373	10	**383**
Firenze	269	77	**346**
Grosseto	472	428	**900**
Livorno	77	71	**148**
Lucca	248	391	**639**
Massa Carrara	134	0	**134**
Pisa	175	37	**212**
Prato	45	67	**112**
Pistoia	130	104	**234**
Siena	310	291	**601**
TOTALE	**2.233**	**1.476**	**3.709**

Fonte: O.E.V.R.

Tabella 3: Numero di campioni di volpi ed altri selvatici indicatori

Specie	Campagna 2006-2007	Campagna 2007-2008	Campagna 2008-2009	Tot
Volpe	216	57	45	**318**
Lupo	2	0	0	**2**
Cornacchia	48	19	19	**86**
Corvo	7	17	2	**26**
Altri carnivori	0	1	2	**3**
Gazza	38	0	0	**38**
TOTALE	**311**	**106**	**68**	**485**

Fonte: O.E.V.R.

/Tabella 4: Numero di campioni di volpi e altri selvatici indicatori distribuiti su base provinciale

Provincia	Campagna 2006-2007	Campagna 2007-2008	Campagna 2008-2009	Tot
Arezzo	13	33	24	**70**
Firenze	7	1	5	**13**
Grosseto	106	4	0	**110**
Livorno	0	1	3	**4**
Lucca	1	9	1	**11**
Massa Carrara	0	42	33	**75**
Pisa	1	1	1	**3**
Prato	1	1	0	**2**
Pistoia	100	12	0	**112**
Siena	82	2	1	**85**
TOTALE	**311**	**106**	**68**	**485**

Fonte: O.E.V.R

I risultati dimostrano come la Regione Toscana sia nelle condizioni di poter richiedere la qualifica di "Regione a bassa prevalenza di Trichine" ai sensi del Regolamento (CE) n. 2075/2005.
I dati ottenuti non solo sono stati in grado di soddisfare pienamente i requisiti previsti dal regolamento (CE) n. 2075/2005 (prevalenza della parassitosi < di 0,5% con il 95% di livello di confidenza), ma anche di svelare prevalenze < a 0,2% con il massimo di certezza possibile, ovvero con il 99,5% di confidenza.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Decreto dirigenziale n. 89 del 14 gennaio 2008 relativo all' "Approvazione della modulistica per le attività di controllo ufficiale relative alla presenza di Trichine nelle carni" di cui alla deliberazione Giunta Regionale n° 926 del 10 dicembre 2007. http://web.rete.toscana.it/attinew/
2. Delibera di Giunta della Regione Toscana n. 926 del 10 dicembre 2007 relativa alle "Linee di indirizzo per l'applicazione del regolamento (CE) n. 2075/2005 che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di *Trichine* nelle carni". **http://web.rete.toscana.it/attinew/**
3. Nota della Regione Toscana prot. AOO-GRT/311134/125.5.4.6 del 16 novembre 2006;
4. Nota della Regione Toscana prot. AOO-GRT n. 0111157/Q.110.40 del 24 aprile 2009;
5. Piano Sanitario Regionale 2008-2010; **http://www.regione.toscana.it/regione/export/RT/sitoRT/Contenuti/sezioni/salute/servizio_sanitario_regionale/rubriche/piani_progetti/visualizza_asset.html_1836925955.html**
6. Pozio E, Rossi P. Guidelines for the detection of Trichinella larvae at the slaughterhouse in a quality assurance system. Ann Ist Super Sanità 2008, Vol. 44, No.2: 195-199;
7. Pozio E, Rossi P. Guidelines for the identification and development of sampling methods and design of suitable protocols for monitoring of Trichinella infection in indicator species. Ann Ist Super Sanità 2007, Vol. 44, No.2: 200-204;
8. Regolamento (CE) n. 2075/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di trichine nelle carni". **http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0060:0082:IT:PDF**

SUMMARY

European Commission promulgated Reg. 2075/2005 in order to prevent trichinosis in men and animals. This particular law considers low-prevalence areas if ten years of a not positive status is present and if the wild sensitive fauna is also monitored. The data of 2006-2009 demonstrates that in Tuscany there is still a low-prevalence status that can be successfully obtained.

PARAMETRI EMATOLOGICI E DI IMMUNITA' ASPECIFICA IN POLLI DA CARNE ALIMENTATI CON DIETE CONTAMINATE DA OCRATOSSINA A E INTEGRATE CON LICOPENE

Mellia E.[1], Salamano G.[1], Pozzo L.[2], Rotolo L.[2], Schiavone A.[2], Cavallarin L.[3], Antoniazzi S.[3], Gennero M.S.[1], Doglione L.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino

[2]Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia. Università di Torino

[3]Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari. CNR - Torino

Key words: broiler, ochratoxin A, lycopene

ABSTRACT

Mycotoxins, fungal secondary metabolites that are toxic to vertebrates, are considered to be unavoidable contaminants in foods and feeds and are a major problem all over the world. Several natural and synthetic compounds with antioxidant properties seem to be potentially efficient in protecting against the toxic effects of micotoxins. This work aimed to study some hematological traits (α1 acid glycoprotein, lysozyme and heterophil to lymphocyte ratio) in broiler chickens fed a diet supplemented with lycopene during a repeated exposure to ochratoxin A.

INTRODUZIONE

I mangimi destinati agli animali da reddito risultano spesso contaminati da micotossine e tale contaminazione è difficilmente controllabile in quanto influenzata da molteplici fattori, sia di tipo ambientale che agronomico. L'impatto delle micotossine sulla salute umana e animale, i danni economici connessi, il numero delle derrate contaminabili e il fatto che il 25% circa dei cereali prodotti nel mondo risultano contaminati evidenziano come le micotossine rappresentino un rischio emergente e rilevante (1, 10). Le micotossine sono un gruppo di metaboliti secondari tossici sintetizzati da funghi in particolari condizioni ambientali di elevata temperatura e umidità relativa; è stato dimostrato che più di 300 micotossine sono in grado di indurre tossicità sia nei mammiferi che nelle specie avicole (2, 6) e oltre agli effetti acuti o cronici riscontrabili in una micotossicosi, alcune sono causa certa di tumori nell'uomo (8). Tra le micotossine, l'ocratossina A (OTA), elaborata da miceti dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, è stata classificata come appartenente al gruppo 2B, in cui rientrano gli accertati cancerogeni per gli animali e i possibili cancerogeni per l'uomo (IARC, 2002). Oltre a questi effetti cancerogeni l'OTA è in grado di provocare gravi disordini e sintomi di tossicità sia acuta (a livello renale, epatico, ematico e immunitario), sia cronica (con aspetti di tipo mutageno, teratogeno e immunosoppressivo) (11).

La dieta del pollo da carne è composta da cereali e da residui della loro lavorazione, da legumi e sottoprodotti dell'industria olearia che, nell'insieme, costituiscono un substrato ideale per la crescita di funghi produttori di OTA. Nella legislazione comunitaria non sono previsti limiti massimi ammissibili per l'OTA nei mangimi; l'Italia però, con il decreto del Ministero della Salute 15 maggio 2006, ha stabilito che il valore massimo dell'OTA nei mangimi per pollame con umidità al 12% non deve superare 0.1 mg/kg, come suggerito dall'EFSA.

Molti composti naturali e sintetici con proprietà antiossidanti sembrano avere una potenziale efficacia nella protezione contro gli effetti tossici delle micotossine. Gli antiossidanti, infatti, sono degli inibitori che abbassano la concentrazione dei radicali liberi, impedendo il deterioramento ossidativo di una vasta gamma di substrati. Alcuni carotenoidi sono potenti antiossidanti e tra questi il licopene sembra essere il più efficiente disattivante di ossigeno singoletto (oxygen quencher), grazie alla presenza di due ulteriori doppi legami rispetto alla struttura degli altri carotenoidi (5).

Il rapporto eterofili/linfociti (E/L), l'α1 glicoproteina acida (GPA) e il lisozima sono utili parametri per valutare la risposta allo stress dei polli. Gli eterofili sono i granulociti predominanti degli uccelli e hanno funzione analoga ai neutrofili dei mammiferi: il rapporto E/L è considerato un sensibile marker di stress (3). La GPA è una proteina di fase acuta positiva dei polli la cui concentrazione ematica aumenta in risposta ad un turbamento dell'omeostasi dell'organismo (4). Il lisozima è un potente enzima antibatterico la cui azione è sinergica con la risposta immunitaria umorale e con i fattori del complemento (9); GPA e lisozima sono entrambi fattori di immunità aspecifica.

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'integrazione di licopene in diete per broiler contaminate da OTA, analizzando le concentrazioni seriche di GPA, lisozima e il rapporto eterofili/linfociti.

MATERIALI E METODI

Un totale di 72 broiler maschi sono stati suddivisi casualmente in 4 gruppi sulla base della dieta somministrata, in modo da avere 3 repliche per ciascun tipo di dieta: gruppo C (controllo, alimentato con dieta basale); gruppo O (dieta basale + OTA 200 µg/kg s.s.); gruppo O+L (dieta basale + OTA 200 µg/kg s.s. + licopene 500 mg/kg s.s.); gruppo L (dieta basale + licopene 500 mg/kg s.s.). I broiler sono stati allevati per 35 giorni, dal giorno 1 al giorno 35. I prelievi ematici sono stati effettuati al termine del ciclo di allevamento. Sul sangue intero è stata eseguita la conta leucocitaria mediante camera di Neubauer modificata e per la conta differenziale sono stati valutati gli strisci di sangue ottenuti. Sul siero è stata misurata la concentrazione della GPA (µg/ml) tramite un kit commerciale basato sul metodo dell'immunodiffusione radiale (Cardiotech Services, Inc.) e la concentrazione del lisozima (µg/ml) misurando l'alone di inibizione della crescita di *Micrococcus lysodeikticus* incluso in gel di agar (7). Il contenuto di OTA è stato valutato tramite HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) secondo la metodica descritta da Entwisle *et al.* (1) per i mangimi e da Zimmerli e Dick (12) per i sieri. Gli estratti sono stati purificati tramite colonnine ad immunoafinità (OchraTest ® Vicam L.P., Watertown, MA, USA). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il trattamento alimentare come fonte di variazione.

RISULTATI

I valori medi della concentrazione sierica di OTA del gruppo O e del gruppo O+L sono statisticamente più elevati di quelli ottenuti nei gruppi C e L. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi per le concentrazioni di GPA e lisozima e per il rapporto E/L (Tab. 1).

DISCUSSIONE

Nonostante la presenza di ocratossina A nel siero dei gruppi O e O+L di circa 5 volte superiore rispetto ai gruppi C e L, nessuno dei parametri considerati ha mostrato variazioni statisticamente significative e anche l'aggiunta alla razione

di licopene non sembra aver sortito alcun effetto. Sia la GPA, che il lisozima, che il rapporto E/L sono marker biologici sensibili le cui variazioni possono indicare un turbamento dell'omeostasi dell'organismo. Nella sperimentazione è stata utilizzata una quantità di OTA (200 µg/kg s.s.) doppia rispetto a quella ammessa dal decreto del Ministero della Salute 15 maggio 2006: potrebbe essere possibile che, per osservare delle variazioni significative tra i gruppi e tra i parametri considerati, tale concentrazione di OTA non sia sufficiente. Allo stesso modo, a tali concentrazioni di OTA, il licopene potrebbe non aver esplicato la sua eventuale azione detossificante, ma ciò non implica che non possa funzionare come antiossidante nel caso di contaminazioni a più elevata concentrazione di OTA. Resta però il fatto che il licopene non sembra aver avuto nemmeno un'azione nutraceutica, in quanto sia parametri ematologici che quelli dell'immunità aspecifica del gruppo di controllo C e del gruppo L sono uguali.

BIBLIOGRAFIA

1. Entwisle A.C., Alison C.W., Peter J.M., Philips T.S., 2000. Liquid Chromatographic Method with Immunoaffinity Column Clean-up for Determination of Ochratoxin A in Barley. Journal of AOAC International 83, 6, 1377-1383
2. Fink-Gremmels J., 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. Veterinary Quarterly 21: 115–120
3. Gross W.B., Siegel H.S., 1983. Evaluation of the heterophil: lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian Diseases., 27: 972-979.
4. Gruys E., Obwolo M.J., Toussaint M.J.M., 1994. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. Veterinary Bulletin 64, 1009-1018.
5. Langeseth L., 1995. Oxidants and Antioxidants; ILSI Europe Concise Monograph Series; ILSI Press: Washington, DD.
6. Leeson S., Diaz G., Summers J.D., 1995. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins, University Books, Guelph, Canada.
7. Osserman E.F., Lawlor D.P., 1966. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. Journal of Experimental Medicine 24(5):921-52.
8. Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organization. 77: 754-766.
9. Prager E.M., Jollès P., 1996. Animal lysozymes c and g: An overview. In: P. Jollès, Editor, Lysozyme: Model Enzymes in Biochemistry and Biology, Birkhäuser-Verlag Basel, Switzerland pp. 9-31.
10. Wood G.E., 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. Journal of Animal Science 70: 3941-3949.
11. Yannikouris A., Jouany J.P., 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Animal Research 51: 81-99.
12. Zimmerli B., Dick R., 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. Journal of Chromatography B 660:85-99.

Tabella 1 – Concentrazioni seriche di ocratossina A, α1 glicoproteina acida, lisozima e rapporto eterofili/linfociti di broiler del gruppo C (controllo, alimentato con dieta basale); O (dieta basale + OTA 200 µg/kg s.s.); O+L (dieta basale + OTA 200 µg/kg s.s. + licopene 500 mg/kg s.s.); L (dieta basale + licopene 500 mg/kg s.s.)

	C	O	O + L	L	P
OTA (ng/ml)	$0.21_a \pm 0.11$	$0.99_b \pm 0.39$	$0.97_b \pm 0.12$	$0.28_a \pm 0.16$	<0.001
GPA (µg/ml)	382.6 ± 114.8	360.5 ± 145.4	296.3 ± 82.2	377.9 ± 123.2	n.s.
lisozima (µg/ml)	3.50 ± 0.88	3.75 ± 2.08	4.13 ± 2.37	2.98 ± 0.66	n.s.
E/L ratio	0.42 ± 0.12	0.53 ± 0.28	0.43 ± 0.26	0.51 ± 0.22	n.s.

IMPIEGO DEL CONTROLLO FUNZIONALE POSITIVO SOTTOPOSTO A CONGELAMENTO NEL TEST RAPIDO PRIONICS CHECK PRIOSTRIP: STUDIO DI VALIDAZIONE

Meloni D., Ingravalle F., Cavarretta M. C., Manzardo E., Lo Previte D., Di Vietro D., Nocilla L., Bozzetta E.

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Centro di Referenza Nazionale per lo studio e le ricerche sulle Encefalopatie Animali e neuropatologie comparate (CEA)

Key words: test rapido, controllo positivo, congelamento

ABSTRACT

Active surveillance programs for Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the European Union are based on the appliance of rapid tests for the screening of the disease on bovines over 48 months of age. The Italian surveillance network applies the Prionics Check PrioSTRIP rapid test. One of the major problem in small laboratories processing few samples is to avoid the waste of the positive control while complaining with the Standard Operating Procedures issued according to ISO IEN 17025. In the present report we show how frozen reconstituted positive control could be used instead of fresh one for this purpose.

INTRODUZIONE

L'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) è una malattia neurodegenerativa indotta da un agente trasmissibile comunemente noto come prione. E' caratterizzata dall'accumulo nel sistema nervoso centrale (SNC) di una isoforma anomala della proteina prionica naturale (PrP^{c}) denominata PrP^{res}.

La sorveglianza attiva nei confronti della BSE è stata introdotta in Italia nel 2001(1). Parte integrante del programma di sorveglianza è rappresentato da una procedura di screening standardizzata. Per assicurarne l'uniformità di applicazione, sono statI validatI a livello comunitario in anni successivi diversi test diagnostici rapidi dei quali 9 sono attualmente autorizzati.

I 23 laboratori Test Rapidi appartenenti alla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali utilizzano dal 2008 per la diagnosi della BSE il test Prionics Check PrioSTRIP (4), immunodosaggio a flusso laterale che utilizza due anticorpi monoclonali differenti per individuare le frazioni della PrP resistenti alla proteinasi.

Il test Prionics Check PrioSTRIP prevede quattro fasi: omogeneizzazione, digestione con proteasi, preincubazione, e rilevamento. Il kit diagnostico contiene al suo interno l'occorrente per l'esecuzione di 470 test con validità di 12 mesi dalla data di produzione di tutti i componenti del kit integro conservato a 5 +/- 3 °C. Tuttavia la scadenza dei componenti diluiti, aperti o ricostituiti è variabile dai 12 mesi, a 5 +/- 3 °C, alle 12 ore, a temperatura ambiente (come avviene per i controlli positivi e negativi ricostituiti). Ciò può determinare una limitata adattabilità del sistema alla routine diagnostica.

Il numero di test rapidi eseguiti quotidianamente in ciascun laboratorio italiano è tendenzialmente stabile mentre vi è notevole variabilità tra il numero di test effettuati da un laboratorio rispetto ad un altro. Ciò influisce sull'effettiva utilizzabilità da parte dei diversi laboratori del potenziale applicativo del kit diagnostico: in considerazione della shelf life dei controlli positivi e negativi ricostituiti infatti, esso raggiunge livelli ottimali solo quando il kit stesso viene esaurito nel periodo di 5 giorni lavorativi. I laboratori italiani mediamente processano circa 60 campioni/die (escludendo gli estremi di 2 - 700 campioni/die); dunque la mancanza di adattabilità del sistema alla routine diagnostica può portare ad un sistematico dispendio di risorse economiche.

Presso i laboratori del CEA è stato condotto uno studio di validazione al fine di definire una procedura operativa che consentisse di utilizzare la stessa fiala di Controllo funzionale Positivo (d'ora in avanti indicato con CP) per più prove (piastre), anziché per una sola, mediante suddivisione della soluzione reidratata in più aliquote sottoposte a congelamento.

MATERIALI E METODI

Studio di validazione

Il CP ricostituito è stato sistematicamente suddiviso in 10 aliquote da 40 ul ciascuna, di cui 9 sono state sottoposte a congelamento a -20°C. La dispensazione in piastra di una delle suddette aliquote è stata preceduta da una fase di scongelamento di 15 minuti circa a temperatura ambiente.

Al fine di valutare se la nuova procedura operativa alterasse il CP congelato, in termini di valori di RDU, in ciascun giorno lavorativo compreso tra il 9/2/2009 ed il 20/4/2009, sono stati processati, nella medesima piastra, un CP fresco in accordo al protocollo ufficiale del test ed una aliquota decongelata. Pertanto sono stati utilizzati 49 CP applicando la procedura ufficiale Prionics (d'ora in avanti denominati *Gruppo1*) e 5 CP (ognuno ripartito in 10 aliquote) applicando la nuova procedura. Questi 5 controlli positivi e le loro aliquote d'ora in avanti verranno denominati *Gruppo2*.

Analisi statistca

Si è proceduto al confronto statistico tra la variabilità del *Gruppo1* e del *Gruppo2*, distintamente per ognuno dei 5 CP del *Gruppo2*, utilizzando il test di Brown and Forsyth (2) per l'uguaglianza delle deviazioni standard (*sd*). L'assunto alla base del confronto è che se la nuova procedura mantiene inalterate le aliquote congelate provenienti dal medesimo campione fresco, allora la variabilità della RDU di queste dovrebbe essere sovrapponibile a quella dei campioni del *Gruppo1*.

Nel caso in cui dal suddetto confronto risulti che la variabilità dei due gruppi possa considerarsi uguale, è opportuno procedere alla progettazione del monitoraggio nel tempo della nuova procedura quando questa verrà applicata in routine. E' stata dunque progettata una carta di controllo per verificare che la RDU prodotta da un'aliquota congelata rientri nei limiti di controllo definiti dal controllo positivo fresco (da cui l'aliquota è stata estratta) ed applicando ad esso la variabilità della RDU dell'intero lotto, stimata in precedenza attraverso lo studio di un campione preliminare di CP freschi.

La costruzione della carta di controllo (3), di cui una versione esemplificativa è riportata nella figura 1, può essere sintetizzata attraverso i seguenti punti:

1) stima della variabilità della RDU dei controlli positivi del lotto: si utilizzano in routine i primi n controlli positivi secondo il protocollo ufficiale del test. La dimensione di n deve essere stabilità prima della costruzione della carta attraverso uno studio ad hoc della variabilità dei CP reidratati. Essa dipende principalmente dal livello di errore attorno alla stima della variabilità che si è disposti ad accettare;
2) calcolare media ($\bar{x}$) e deviazione standard campionarie (sd) secondo le formule:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} xi \qquad sd = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi-\bar{x})^2}$$

si può iniziare ad utilizzare la nuova procedura, producendo *m* aliquote da ciascun controllo positivo impiegato in routine. Di queste, la prima (d'ora in avanti chiamata 'fresco' ed identificata con f_i) viene immediatamente utilizzata, mentre le restanti (*m*-1) aliquote vengono congelate ed utilizzate nelle prove (piastre) successive;

3) al momento dell'impiego di ciascun fresco f_i vengono definiti i limiti (*lim*) di controllo della carta:

$$lim = f_i \pm t_{(n-1),\ 0,025}\ sd$$

dove $t_{(n-1),\ 0,025}$ è il 97.5-esimo percentile della distribuzione T di Student con (*n*-1) gradi di libertà.
In alternativa possono essere definiti altri limiti sostituendo a $t_{(n-1),\ 0,025}$ i valori di 1, 2, 3;

4) si verifica che il processo sia sotto controllo collocando i valori di RDU ottenuti dai campioni congelati sulla carta così costruita;

5) infine, si predispongono delle misure correttive da mettere in atto quando dalla carta emerge che il processo non è più in controllo.

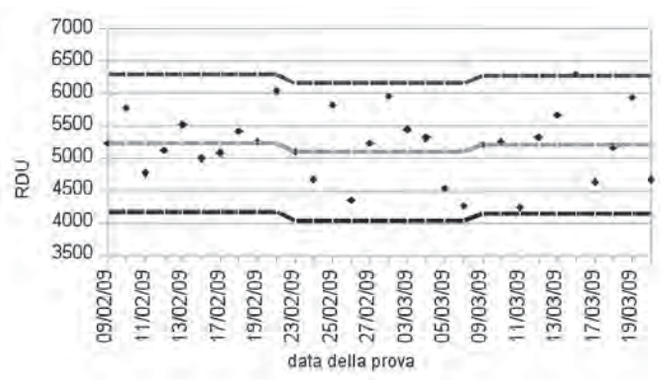


Figura 1: esempio di carta di controllo (per 3 f_i). Le linee nere rappresentano i limiti di controllo, la linea grigia il valore del CP fresco f_i , gli indicatori quadrati rappresentano le RDU delle aliquote congelate.

NB: ogni volta che si utilizza un nuovo fresco f_i, bisogna ridefinire i limiti di controllo (punti 3 e 4). Ogni volta che si inizia un nuovo lotto bisogna revisionare la carta di controllo, dal punto 1 in poi.

RISULTATI

Nella tabella sottostante sono riportati i risultati del test di Brown and Forsyth per l'uguaglianza delle *sd.*

n° del CP fresco del *Gruppo2*	n° di campioni appartenenti a ciascun gruppo	*sd Gruppo1*	*sd Gruppo2*	*p-value*
1	10	417,3	330,7	0,5462
2	10	394,3	623,2	0,5341
3	10	450,7	511,0	0,8300
4	10	508,8	285,6	0,2877
5	9	341,7	457,7	0,9200
tutti i campioni del *Gruppo2* insieme	49	541,8	525,9	0,5490

Da questa emerge che i dati non forniscono sufficiente evidenza statistica per rifiutare l'ipotesi che la variabilità dei due gruppi si possa considerare uguale.
Osservando la figura 2, si può notare che i campioni dei due gruppi presentano un andamento analogo, con escursioni verso gli estremi più accentuate per il *Gruppo1***.** Tale analogia risulta inattesa: era lecito ipotizzare che la RDU registrata dalle aliquote congelate fosse molto simile alla RDU del CP fresco originario e che ciò generasse una nuvola di punti raccolti intorno a quest'ultimo, mentre i campioni del *Gruppo1* avrebbero mostrato un andamento diverso, in quanto erano tutti CP freschi diversi tra loro.

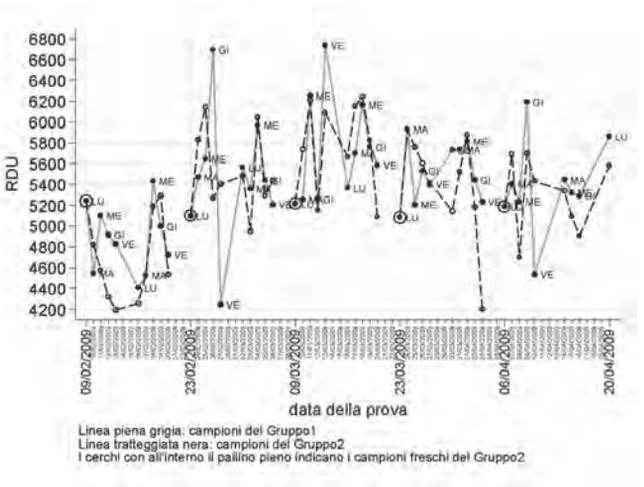


Figura 2: valori di RDU registrati quotidianamente per ciascun campione del *Gruppo1* **e** *Gruppo2*

DISCUSSIONE/CONCLUSIONI

I risultati statistici suggeriscono, nei limiti della numerosità campionaria ad oggi raggiunta, che il processo di congelamento non altera il CP, in termini di RDU. Bisogna però sottolineare l'importanza delle condizioni di laboratorio in cui si è svolto lo studio. Infatti la figura 2 suggerisce che più del congelamento, ad influenzare i valori di RDU (e quindi la sua variabilità) possano incidere fattori di laboratorio non obbligatoriamente legati al tipo di test rapido in uso.
Tuttavia, una volta verificata l'assenza di alterazione della RDU dovuta alla nuova procedura di gestione del controllo positivo, si rende necessario uno strumento, quale la carta di controllo proposta, capace di monitorare il processo nel tempo.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. EC, (2001) Regolamento N. 999/2001 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 maggio 2001 che stabilisce le regole per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di talune Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili. GU L 147 del 31.05.2001, pp. 1-40
2. Brown, M. B., and A. B. Forsythe. 1974. Robust test for the equality of variances. Journal of the American Statistical Association 69: 364-367.
3. Montgomery D.C.(2000), "Controllo statistico di qualità", McGraw_ Hill, Milano;
4. Prionics Chec PrioSTRIP Prionics AG Wagistrasse 27° CH-8952 Schlieren

VALUTAZIONE DELLA ROBUSTEZZA DEL TEST RAPIDO PRIONICS CHECK PRIOSTRIP SU MATRICE AUTOLITICA

Meloni D., Ingravalle F., Cavarretta M. C., Manzardo E., Loprevite D., Di Vietro D., Nocilla L., Maldera O., Bozzetta E.
[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Centro di Referenza Nazionale per lo studio e le ricerche sulle Encefalopatie Animali e neuropatologie comparate (CEA)

Key words: Test rapido, Autolisi, Performances.

ABSTRACT
In the European Union, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) active surveillance programs are based on the application of rapid tests approved according to Regulation 999/2001 and further modifications. In Italian Laboratories the test Prionics Check PrioSTRIP is used for this purpous. Results of the first 9 months of surveillance in CEA laboratories show a consistent decrease of the performances in terms of specificity of the test when applied on autolyzed matrix, in comparison with other diagnostic systems.

INTRODUZIONE
L'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) è una malattia neurodegenerativa indotta da prioni. La BSE é caratterizzata dall'accumulo nel sistema nervoso centrale (SNC) di una isoforma anomala della proteina prionica naturale (PrP^c) denominata PrP^{res}. La PrP^{res} può essere differenziata dalla PrP^c per la caratteristica insolubilità e per la parziale resistenza alle proteasi: tale proprietà viene sfruttata dalla maggior parte dei sistemi diagnostici rapidi approvati per la sorveglianza attiva.
L'evidenza dell'origine della variante della Malattia di Creutzfeldt – Jakob (vCJD) dalla BSE, ha indotto la Comunità Europea (CE) ad introdurre a partire dal 2001(1) piani di sorveglianza attiva, per mezzo dei test rapidi, per il monitoraggio dell'infezione nei ruminanti.
I campioni testati nell'ambito della sorveglianza attiva provengono principalmente da animali regolarmente macellati e quindi giungono in laboratorio in buone condizioni di conservazione (Figura 1); tuttavia, una percentuale non trascurabile di campioni, il 17% nei primi 9 mesi di sorveglianza attiva presso il CEA, proviene da morti in stalla, di cui il 13 % circa presenta fenomeni autolitici più o meno evidenti a causa della possibilità di gap temporale tra morte ed esecuzione del prelievo del campione, o di altri fattori (Figure 2, 3, 4).
La "robustezza" dei test quando applicati su materiale autolitico, ossia il mantenimento delle performances su materiale in condizioni di conservazioni non ottimali, rappresenta quindi un parametro di cruciale importanza per l'efficienza del sistema di sorveglianza attiva.
La Commissione Europea (CE) ha valutato e approvato dal 1999 ad oggi 9 test rapidi per la sorveglianza attiva.della BSE. Dopo la prima validazione di test rapidi *post-mortem* per BSE, condotta nel 1999, in cui si teneva conto solo dei parametri fondamentali di sensibilità e specificità diagnostica dei metodi e della loro sensibilità analitica, nel corso delle seguenti valutazioni sono stati presi in considerazione anche altri indicatori di buon funzionamento e di robustezza dei test nella routine diagnostica, tra i quali la verifica della percentuale di campioni "inizialmente reattivi" (campioni con risultato positivo alla prima prova, che risultano negativi alla riprova) e di falsi positivi in caso di autolisi.
Tutti i 23 laboratori Test Rapidi appartenenti alla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali utilizzano per la diagnosi della BSE il test Prionics Check PrioSTRIP (4), immunodosaggio a flusso laterale che utilizza due anticorpi monoclonali differenti per individuare le frazioni della PrP resistenti alla proteinasi.
Nel presente lavoro viene evidenziato come l'autolisi del campione influenzi negativamente le performances in termini di robustezza e specificità diagnostica del test in uso.

MATERIALI E METODI
Nel corso dei primi 9 mesi di sorveglianza attiva della BSE con il nuovo test rapido Prionics Check PrioSTRIP presso il CEA di Torino sono stati sottoposti a test 1951 bovini morti in stalla o durante il trasporto dei quali 256 presentavano fenomeni autolitici più o meno gravi.
Il test prevede una procedura che comprende quattro fasi: omogeneizzazione del campione, digestione con proteasi, preincubazione e rilevamento. Il protocollo operativo dei test rapidi implica, in caso di iniziale reattività, la ripetizione della prova a partire dalla digestione dell'omogenato con distribuzione del campione in doppio pozzetto. In caso di esito negativo in doppio, per il campione viene emesso esito di negatività; qualora invece si evidenzi un esito positivo anche in uno solo dei due pozzetti si procede a sottoporre il campione alla conferma diagnostica con i metodi previsti dalla normativa specifica. La ditta produttrice ha consigliato verbalmente, al fine di ridurre la reattività dei campioni autolitici alla riprova in doppio, di sottoporre a congelamento l'omogenato prima di procedere alla riprova stessa.
E' stata quantificata l'iniziale reattività del test rapido su campioni autolitici calcolando la percentuale di questi riscontrati tra i morti in stalla o durante il trasporto, (d'ora in avanti indicata con *p*) **unitamente al suo intervallo di confidenza al 95% (IC95%, exact method).**

RISULTATI
Dei 256 campioni autolitici analizzati, 36 hanno manifestato una iniziale reattività in prima analisi, pari al 14,1% (IC95%: 10,0% - 18,9%). Nel corso della ripetizione in doppio 34 sono risultati negativi, 2 si sono confermati positivi ma hanno dato esito negativo alle successive prove di conferma diagnostica.

DISCUSSIONE/CONCLUSIONI
Il field trial condotto in ambito EU al fine dell'autorizzazione al commercio di un nuovo test rapido prevede, in accordo all'opinion del SSC (Scientific Steering Committee) "Design of a field trial for the evaluation of new rapid BSE *post mortem* tests" del 22 febbraio 2002 (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out246_en.pdf), anche la valutazione della robustezza, mediante l'analisi di 200 campioni di tronco encefalico provenienti da animali morti in stalla e in condizioni di autolisi, risultati negativi a un test rapido di riferimento. Il test rapido Prionics Check PrioSTRIP aveva in quell'ambito dato luogo a 2 campioni inizialmente reattivi ed un falso positivo.
Un recente studio sperimentale condotto presso il CEA da Meloni e Coll. (2) ha valutato la robustezza in termini di performances su matrice autolitica, dei test rapidi Prionics Check-LIA, Enfer TSE versione 2.0, il Biorad TeSeE e IDEXX Herd Check BSE Antigen Kit EIA. 450 campioni autolitici sono stati testati in parallelo con i suddetti test. Il Biorad TeSeE ha identificato correttamente alla prima prova tutti i campioni (*p*=0%, IC95%: 0% - 0,82%). L'Enfer TSE version 2.0 ha dato luogo a 4 risultati inizialmente reattivi (*p*=0,89%, IC95%: 0,24% - 2,26%), il Prionics Check-LIA ad un campione (*p*=0,22%, IC95%: 0,006% - 1,23%) ed infine l'IDEXX HerdChek BSE Antigen Kit a due iniziali reattività (*p*=0,44%, IC95%: 0,05% - 1,60%). Tuttavia, i campioni inizialmente reattivi, nel corso della ripetizione in doppio come previsto dalle relative metodiche, sono risultati tutti negativi, dando luogo a parametri di specificità del 100%

per tutti i test (IC95%: 97.57% - 100%).
Sulla base dei dati raccolti presso il CEA nei primi nove mesi di sorveglianza attiva con il test rapido Prionics Check PrioSTRIP sembra emergere come il test sia in grado di garantire performances ottimali relativamente a robustezza e specificità qualora i campioni analizzati si presentino in buono stato di conservazione, ma si assiste ad un decadimento di tali parametri in presenza di autolisi del tessuto. Infatti, il limite inferiore dell'IC95% della percentuale di autolitici inizialmente reattivi è ben più elevato rispetto al limite superiore degli analoghi IC95% mostrati dai quattro test rapidi oggetto dello studio precedentemente citato (2).
La differenza con i dati riferibili alla validazione europea mette in evidenza come solo nel momento in cui il test viene applicato in routine, in condizioni climatiche diverse emerga la reale robustezza del sistema.
I risultati falsi positivi oltre a palesare chiaramente problemi legati alle caratteristiche intrinseche e di componentistica del test rapido, si ripercuotono evidentemente sul lay out del laboratorio così come sul sistema sanitario nazionale in quanto innescano una serie di misure sanitarie di protezione mirate principalmente al blocco degli allevamenti interessati con divieto di spostamento degli animali, di macellazione, di commercializzazione del latte e derivati, fino alla conferma del risultato diagnostico, che si ottiene generalmente dopo diversi giorni. L'ulteriore accertamento diagnostico comporta inoltre, un notevole dispendio economico a fronte di campioni verosimilmente negativi. I risultati inizialmente reattivi, d'altra parte qualora siano in numero rilevante, causano un notevole aggravio dell'attività di laboratorio.

Riferimenti bibliografici

1. EC (2001) Regolamento N. 999/2001 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 maggio 2001 che stabilisce le regole per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di talune Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili. GU L 147 del 31.05.2001, pp. 1-40

2. D. Meloni, R. Nappi, D. Di Vietro, M.C. Cavarretta, F. Ingravalle, E. Bozzetta. Studio comparativo della specificità dei test rapidi per BSE su campioni di tronco encefalico in condizioni di autolisi. Large Animal Review 2007; 13 : 59-63

3. E.S. Pearson, H.O. Hartley, "Biometrika tables for statisticians", vol.2 (1972), tabella 5, pag. 178

4. Prionics Chec PrioSTRIPPrionics AG Wagistrasse 27° CH-8952 Schlieren

Figura 1 Tessuto non autolitico

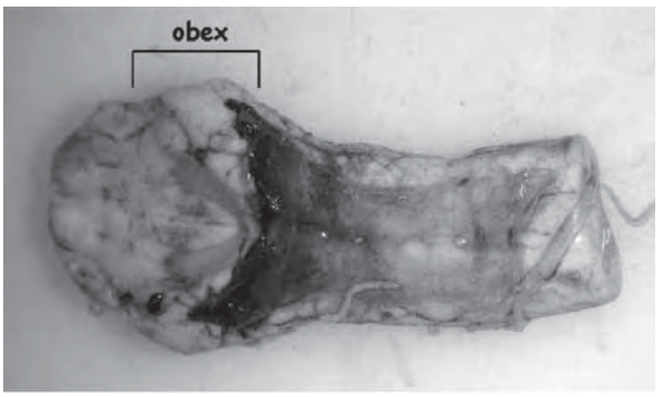


Figura 2 Lieve autolisi

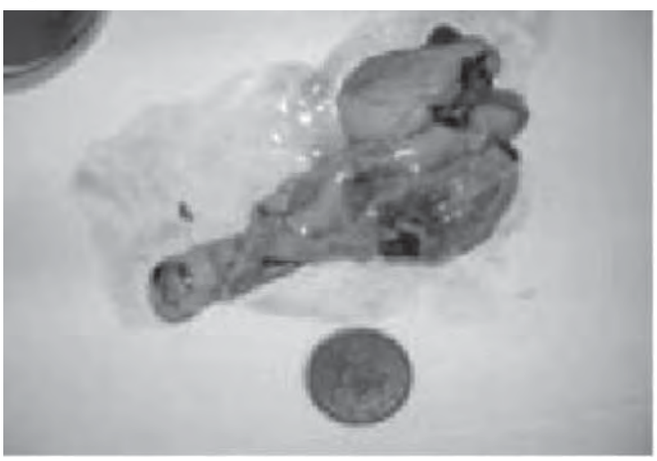
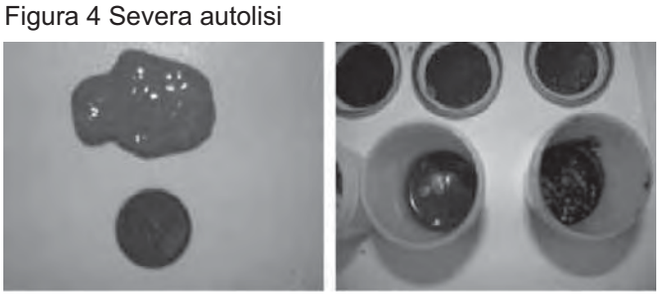


Figura 3 Marcata autolisi

Figura 4 Severa autolisi



DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITA' *IN VITRO* DI 38 CEPPI DI *A. PLEUROPNEUMONIAE* BIOTIPO 1 ISOLATI NEL 2009 NEI CONFRONTI DI 16 PRINCIPI ATTIVI

Merenda M., Cevidalli A.E.[1], Barigazzi G.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Umbertini"
Sezione di Parma, Via dei Mercati 13/A, 43100 Parma
[1] Intervet Schering-Plough Animal Health, Palazzo Borromini, 20090 Segrate (Mi)

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1, antimicrobials, MIC

SUMMARY
Thirty-eight italian *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates recovered from pigs with pleuropneumoniae were tested for susceptibility to 16 antimicrobials.
All the isolates were susceptible to Ceftiofur and Enrofloxacin and most of them to Danofloxacin, Gentamycin, Tiamulin, Tulatromycin and Tilmicosin.
Six isolates were resistant to Florfenicol and a high rate of resistance was observed to Tetracycline. The distribution of isolates over the MIC range observed for Penicillin and Ampicillin, suggested the development of resistance.

INTRODUZIONE
Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) biotipo 1 è un coccobacillo gram negativo responsabile della pleuropolmonite suina, una grave patologia respiratoria che rappresenta un serio problema nell'allevamento suinicolo intensivo in ogni parte del mondo.
La forma peracuta/acuta è caratterizzata da elevata contagiosità ed esito spesso fatale, con conseguenti ingenti perdite economiche legate alla mortalità elevata.
La pleuropolmonite può inoltre decorrere in forma cronica o subclinica, determinando diminuzione dell'accrescimento dei gruppi interessati ed aumento delle spese sanitarie relative a medicazioni ed eventuali vaccinazioni (3).
Ad oggi si riconoscono 13 sierotipi di APP biotipo 1 (3).
Tutti i sierotipi sono potenzialmente patogeni ma esiste una differenza nella virulenza e nella distribuzione geografica dei diversi ceppi (3).
Nonostante siano descritti diversi metodi per la prevenzione ed il controllo della pleuropolmonite suina (profilassi diretta, all in/all out, svezzamento precoce, vaccinazione), il trattamento antibiotico rimane a tutt'oggi un presidio necessario per la gestione dei focolai di pleuropolmonite in allevamento.
L'uso corretto delle sostanze antimicrobiche non può prescindere, pertanto, da una attenta valutazione della sensibilità *in vitro* dei ceppi di APP nei confronti dei principi attivi disponibili al fine di monitorare l'instaurarsi di fenomeni di resistenza, che possono tra l'altro assumere connotazioni diverse a seconda del Paese e del sierotipo considerati.
Scopo di questo studio è stato quello di determinare la sensibilità antimicrobica di ceppi di APP biotipo 1 isolati nel 2009.

MATERIALI E METODI
Lo studio include 38 ceppi di APP biotipo 1 isolati nel 2009 da polmoni suini conferiti presso la Sezione Diagnostica di Parma, provenienti da allevamenti del nord Italia. I ceppi sono stati isolati su Agar sangue addizionato di NAD e con coltura-balia di *Staphylococcus aureus*. Gli isolati sono stati sierotipizzati mediante sieroagglutinazione rapida su vetrino con antisieri sierotipo-specifici.
La sensibilità antimicrobica degli isolati è stata determinata mediante metodo della microdiluizione in piastra utilizzando un prodotto commerciale costituito da piastre a 96 pozzetti contenenti un pannello di antibiotici disidratati a diverse concentrazioni (Sensititre: Trek Diagnostic System Inc). Gli agenti antimicrobici utilizzati e le rispettive diluizioni d'uso sono state le seguenti: Ceftiofur (TIO) 0,25-8 µg/ml; Tiamulina (TIA) 1-32 µg/ml; Clortetraciclina (CTET) 0,5-8 µg/ml; Gentamicina (GEN) 1-16 µg/ml; Florfenicolo (FFN) 0,25-8 µg/ml; Ossitetraciclina (OXI) 0,5-8 µg/ml; Penicillina (PEN)0,12-8 µg/ml; Ampicillina (AMP) 0,25-16 µg/ml ; Danofloxacin (DANO) 0,12-1 µg/ml; Sulfadimetossina (SDM) 256 µg/ml; Trimethoprim/Sulfametossazolo (SXT) 2/38 µg/ml; Spectinomicina (SPE) 8-64 µg/ml; Tilosina tartrato (TYLT) 0,5-32 µg/ml; Tulatromicina (TUL) 1-64 µg/ml; Tilmicosina (TIL) 4-64 µg/ml; Enrofloxacin (ENRO) 0,12-2 µg/ml.
L'allestimento e la valutazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente) sono stati effettuati secondo le raccomanzioni del CLSI (2). Il valore della MIC è stato considerato come la minima diluizione di antibiotico in grado di inibire una crescita batterica visibile.
Per tutti i microrganismi testati sono stati annotati i valori di MIC di ciascun principio attivo e sono stati calcolati le percentuali di sensibilità (%S), resistenza (%R) e di risposta intermedia (%I). I breakpoint utilizzati per TIO, TIA, CTET, GEN, FFN, OXY, DANO, SDM, SPE, TUL, TIL ed ENRO sono quelli raccomandati dal CLSI (2). Per i rimanenti antibiotici, per i quali tale valore non è disponibile, è stata considerata solo la distribuzione dei ceppi batterici nel range di MIC ottenuto.

RISULTATI E DISCUSSIONE
I sierotipi di APP biotipo 1 più frequentemente isolati sono stati il sierotipo 9 (53%) ed il sierotipo 2 (32%). Sono stati inoltre identificati i sierotipi 4, 5, 8.
I risultati del test di sensibilità agli antibiotici, espressi come distribuzione dei valore di MIC ottenuti per i diversi antibiotici, sono riportati in Tabella 1.
Come si può osservare nella tabella, Ceftiofur, Tiamulina Danofloxacin, Enrofloxacin, Tulatromicina e Tilmicosina mostrano un elevato grado di attività nei confronti dei microrganismi in esame, con prevalenze di sensibilità superiori al 90%. Una buona attività viene riscontrata inoltre per Gentamicina e Florfenicolo, con valori di sensibilità superiori all'80%.
Per ciò che riguarda il Florfenicolo va tuttavia sottolineata la comparsa di 6 ceppi inibiti solo a valori MIC di 16 µg/ml (15,8% di ceppi resistenti). Questo dato non trova riscontro nello studio analogo effettuato da Barigazzi et al. nel 1996 (1), in cui il florfenicolo mostrava il 100% di attività nei confronti dei microrganismi allora testati.
L'associazione Trimetoprim/Sulfametossazolo possiede una attività di poco inferiore (76,3% di ceppi sensibili), testimoniata anche dalla discreta attività dei sulfamidici (52,6% di ceppi sensibili).
Al contrario le 2 tetracicline testate (CTET, OXY), che come atteso mostrano un comportamento sovrapponibile, sono caratterizzate da prevalenze di resistenza che superano il 60% dei microrganismi in esame.
Questo dato è in linea con quanto evidenziato già negli anni '80 e '90 (4,1) e trova una possibile spiegazione nel vasto impiego delle tetracicline nella realtà suinicola italiana, dove

tale gruppo di antibiotici ha rappresentato per molto tempo uno dei più comuni strumenti di profilassi e terapia.
Per quanto riguarda gli altri principi attivi, per i quali non è possibile determinare l'attività in termini di sensibilità/ resistenza a causa della mancanza di breakpoint di riferimento, si possono effettuare alcune importanti considerazioni.
Per ciò che riguarda l'attività dei beta-lattamici (AMP e PEN) si osserva una distribuzione dei ceppi in 2 blocchi: uno con valori MIC≤ 1µg/ml (15/38), l'altro con valori di MIC≥ 2µg/ml (23/38). Inoltre la maggior parte dei ceppi collocati in quest'ultimo gruppo è inibita da valori MIC di 16/32 µg/ml.
Tale comportamento fa presupporre l'instaurarsi di meccanismi di resistenza di APP biotipo 1 nei confronti di tale categoria di antibiotici, fenomeno che si evidenzia a carico di circa il 60% dei ceppi testati.
Da notare che questo dato appare sostanzialmente diverso da quello riscontrato nel 1984 (4), dove si assisteva ad una distribuzione più omogenea dei microrganismi testati, tutti inibiti da valori di MIC ≤ 1,5 µg/ml per la Penicillina e ≤ 0,4 µg/ml per l'Ampicillina.
In particolare si ricorda che l'autorizzazione a somministrare per OS i beta-lattamici (Ampicillina ed Amoxicillina) è avvenuta successivamente allo studio sopra menzionato (4), essendo possibile allora solo la somministrazione per via parenterale.
Concludendo, i risultati ottenuti confermano la presenza di ceppi di APP biotipo 1 resistenti nei confronti delle tetracicline ed evidenziano l'instaurarsi di fenomeni di resistenza anche nei confronti del florfenicolo. Questi dati, unitamente alla distribuzione delle MIC osservata per le penicilline, suggeriscono la necessità di un continuo monitoraggio della sensibilità *in vitro* dei microrganismi isolati.
Questi risultati sono particolarmente indicativi della realtà di campo, in quanto tutti i microrganismi testati sono stati isolati da animali morti a seguito di pleuropolmonite e presumibilmente già sottoposti a trattamento antibiotico, con molti dei principi saggiati nel presente studio.

Si ringrazia Simona Catelli per la collaborazione tecnica.

BIBLIOGRAFIA

1. Barigazzi G., Candotti P., Foni E., Martinelli L., Raffo A. (1996) – *In vitro* susceptibility of 108 isolated *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to 17 antimicrobial agents from pig lungs in Italy in 1994-95 – Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, Italy, 7-10 July 1996.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) - Performance standards for antimicrobial disk and diluition susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard – third edition, M31-A3, Vol. 28 No. 8
3. Gottschalk M. and Taylor D.J. (2006) – Actinobacillus pleuropneumoniae. In: Diseases of Swine, 9th ed., 563-576.
4. Sidoli L., Barigazzi G., Schianchi P., Russell C.H., Russell S.B. (1984) – Minimum inhibitory concentrations of antibacterial agents against strains of *Hemophilus pleuropneumoniae* from swine – VMSAC, 703 - 705

Tabella 1 – Valori MIC di 16 sostanze antimicrobiche nei confronti di *A. pleurpneumoniae* biotipo 1

Antimicrobici	MIC (µg/ml)													**%S**	**%R**	**%I**
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512			
Ceftiofur		38												100		
Tiamulina						8	23	5	2					94,7	5,3	
Clortetraciclina			11	2	2	10	11	2						28,9	65,8	5,3
Gentamicina				5	26	7								81,6		18,4
Florfenicolo		8	19	4	1			6						84,2	15,8	
Ossitetraciclina			12	2				24						31,6	63,2	5,3
Penicillina	3	7	4	1			1	22								
Ampicillina		15			1	1	1	7	13							
Danofloxacina	36	1	1									20		97,4	2,6	
Sulfadimetossina													18	52,6	47,4	
Trimet/Sulfamet					29	9								76,3	23,7	
Spectinomicina								1	22	7	8			60,5	21,1	18,4
Tilosina							2	9	16	11						
Tulatromicina				4	20	7	3	1			3			92,1	7,9	
Tilmicosina						28	7				3			92,1	7,9	
Enrofloxacina	35	3												100		

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* VEROCITOTOSSINA-NEGATIVI CHE PRODUCONO LA CITOTOSSINA SUBTILASI

Michelacci V., Tozzoli R., Marziano M.L., Caprioli A., Morabito S.

Laboratorio Comunitario e Nazionale di Referenza per Escherichia coli, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Keywords: *Escherichia coli,* Citotossina subtilasi, *subAB*

ABSTRACT

The Subtilase cytotoxin (SubAB) is an AB_5 toxin elaborated by some Verocytotoxin(VT)-producing *Escherichia coli* (VTEC). We report on the production of SubAB in two VT-negative *E. coli* strains from unrelated cases of childhood diarrhea and the characterization of the locus encoding such a cytotoxin. The nucleotide sequence of the *subAB* genes was 90% homologous to that of the prototype *subAB*, located on the large plasmid of the VTEC O113 strain 98NK2 (pO113). Moreover, PCR screening of 61 VTEC revealed the presence of *subAB* in five LEE-negative VTEC strains.

INTRODUZIONE

Alcuni ceppi di *Escherichia coli* diarreagenici sono in grado di produrre tossine definite "AB_5" in quanto sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità A che contiene il sito catalitico e da un pentamero di subunità B coinvolto nel legame con il recettore cellulare. Le tossine AB_5 prodotte da *E. coli* comprendono le Verocitotossine (VT) e la enterotossina termo-labile. Recentemente è stata descritta una nuova tossina AB_5, la citotossina Subtilasi (SubAB), in ceppi di *E. coli* che producono VT (VTEC). Questa tossina, è stata identificata e caratterizzata per la prima volta nel 2004 nel ceppo VTEC O113 98NK2, isolato nel corso di un episodio epidemico di sindrome emolitico uremica in Australia (6). I geni codificanti la SubAB sono localizzati sul plasmide pO113 nel ceppo 98NK2 e sono stati in seguito identificati in altri ceppi VTEC che, analogamente al sierogruppo O113, non possiedono il locus LEE (2, 5), responsabile dell'induzione della caratteristica lesione "attaching and effacing". I geni subAB, inoltre, sono stati spesso trovati in associazione al gene *saa* (2, 5), codificante per un'adesina autoagglutinante e descritto nello stesso pO113 (7).

E' stato ipotizzato che la SubAB possa contribuire alla patogenesi della malattia indotta dai ceppi VTEC esplicando un'attività sinergica con le VT (4).

In questo studio, è descritta per la prima volta la produzione della citotossina Subtilasi in ceppi di *E. coli* VT-negativi.. Inoltre abbiamo identificato i geni codificanti la SubAB in cinque ceppi VTEC che non possiedono la LEE e abbiamo osservato che tali geni possono essere contigui al gene *tia*, che codifica un determinante di invasione descritto in ceppi di *E. coli* enterotossigenici (ETEC) (4).

MATERIALI E METODI

Ceppi Batterici

I ceppi VTEC utilizzati in questo studio sono parte della collezione dell'Istituto Superiore di Sanità. I ceppi VT-negativi ED 32 ed ED 591 sono stati isolati da casi di diarrea e non appartengono a nessun patogruppo noto, in quanto negativi in saggi di PCR diretti all'identificazione dei maggiori fattori di virulenza di *E. coli* diarreagenici.

Saggio di citotossicità su cellule Vero

Supernatanti di coltura sono stati inoculati su monostrati di cellule Vero per identificare la produzione di citotossine, (1). La produzione di VT è stata testata mediante saggi di neutralizzazione con antisieri anti-VT1 e VT2 (1).

Ricerca della presenza dei geni codificanti la SubAB

La presenza dei geni *subAB* è stata saggiata tramite PCR utilizzando primers disegnati sulla sequenza del pO113 del ceppo 98NK2. I primers diagnostici utilizzati, RTsubABF/RTsubABR (6), hanno come target di amplificazione una regione genica a cavallo tra i geni *subA* e *subB.* I ceppi ED 32 ed ED 591 sono stati inoltre saggiati per la presenza delle intere ORF *subA* e *subB* con i primers SubAF/SubAR e SubBF/SubBR (6).

Costruzione e screening della genoteca fagica

Per la costruzione della genoteca fagica del ceppo ED 591 abbiamo utilizzato il "Lambda ZAP II predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit" (Stratagene). I cloni della genoteca sono stati testati tramite ibridazione di tipo Southern utilizzando come sonda il frammento di DNA amplificato dai primers RTsubABF/RTsubABR. Un clone risultato positivo a tale saggio è stato successivamente sequenziato.

Identificazione dei geni saa e tia nei ceppi subAB-positivi

La presenza dei geni *saa* e *tia* è stata esaminata tramite PCR. I primers utilizzati per la ricerca di *saa* sono descritti in letteratura (7), mentre per l'amplificazione di *tia* sono stati utilizzati i primers tia_lo (TCCATGCGAAGTTGTTATCA) e tia_sense (TTCTCTTTTTACCCTGCTTTTTGC) (Fig.1). La contiguità dei geni subAB e tia è stata analizzata mediante amplificazione con la coppia di primers SubBendR (TTATGAGTTCTTTTTCCTGTCAGG)/tia_lo (Fig.1).

RISULTATI

Caratterizzazione dell'effetto citopatico (CPE) nei ceppi ED32 ed ED591

Due ceppi di *E. coli*, ED 32 e ED 591, isolati in Italia rispettivamente nel 1990 e nel 2005 da bambini con diarrea, sottoposti a saggio di citotossicità su cellule Vero inducevano un CPE non neutralizzato dagli antisieri diretti contro VT1 e VT2 e risultavano entrambi negativi per la presenza dei geni *vtx1* e *vtx2*. Inoltre il CPE si distingueva leggermente da quello indotto dalle VT, comparendo dopo 48 h di incubazione a differenza delle 24 h necessarie per visualizzare l'effetto delle VT.

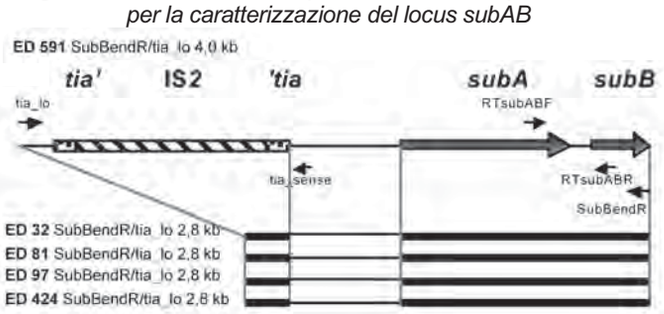
Identificazione del determinante genetico responsabile del CPE

L'induzione del CPE e l'assenza dei geni codificanti le VT hanno suggerito l'ipotesi che i ceppi ED 32 ed ED 591 producessero la citotossina SubAB. Questi ceppi sono stati dunque analizzati per la presenza dei geni codificanti tale tossina ed entrambi sono risultati positivi alla PCR che amplifica una regione a cavallo tra i geni codificanti le due subunità. Gli stessi ceppi però non mostravano alcun prodotto di amplificazione con i primers SubAF/SubAR e SubBF/SubBR, sviluppati sulla sequenza del pO113 del ceppo VTEC 98NK2 (6).

Identificazione e caratterizzazione della regione di DNA contenente i geni codificanti per la SubAB

La mancata amplificazione dei geni *subA* e *subB* con gli oligonucleotidi SubAF/SubAR e SubBF/SubBR ha indotto a ritenere che il locus codificante la citotossina SubAB nei ceppi ED 32 ed ED 591 potesse essere differente da quello descritto nel ceppo 98NK2. E' stata quindi costruita una genoteca fagica del ceppo ED 591 e selezionato un clone di 3,7 kb contenente i geni *subAB*, successivamente sequenziato. L'allineamento delle sequenze di *subA* e *subB* del ceppo ED 591 con le sequenze corrispondenti sul pO113 dava come risultato il 90% di identità a livello nucleotidico. Il frammento clonato conteneva anche una porzione del gene *tia*, codificante un determinante di invasione descritto in ceppi di *E. coli* enterotossigenici (ETEC) (4), interrotto da un elemento IS*2* (Fig.1). E' interessante notare che questa regione di DNA a monte del gene *subA* non era presente nella sequenza del plasmide pO113, suggerendo che nel ceppo ED 591 i geni *subAB* erano localizzati in una regione genomica differente.

Figura 1. Localizzazione dei primers utilizzati in questo studio per la caratterizzazione del locus subAB



Identificazione di ceppi VTEC SubAB-positivi

61 ceppi VTEC sono stati esaminati per la presenza dei geni *subAB* mediante amplificazione con i primers RTSubABF/ RTSubABR (6). Cinque ceppi, ED 81, ED 97, ED 99, ED 186 ed ED 424, hanno mostrato risultato positivo. Tali ceppi non possedevano il gene *eae* localizzato sull'isola di patogenicità (PAI) LEE (Tab. 1).

Abbiamo quindi analizzato la presenza dei geni *tia* e *saa* nei ceppi *subAB*-positivi.Tre ceppi VTEC ed i ceppi ED 32 ed ED 591 possedevano il gene *tia* (Tab. 1). Questi cinque ceppi sono stati sottoposti a reazioni di PCR volte a verificare la contiguità dei geni *subA* e *tia* come osservato nella sequenza del ceppo ED 591. Per quest'ultimo si è ottenuto il prodotto di amplificazione atteso di 4.0 Kb, mentre negli altri ceppi l'amplicone era di 2,8 kb, indicando la stessa architettura osservata per il ceppo ED 591, con l'unica differenza della mancanza dell'elemento IS*2*. I due ceppi negativi per *tia* (ED 99 ed ED 186 possedevano il gene *saa*, assente invece in tutti gli altri isolati (Tabella 1).

Tabella 1. Caratteristiche dei ceppi di E. coli subAB positivi

Ceppo (sierotipo)	*eae*	*stx1*	*stx2*	*tia*	*saa*
ED 32 (O78:H-)	-	-	-	+	-
ED 591 (O8:Hnd*)	-	-	-	+	-
ED 81 (O128:H2)	-	-	+	+	-
ED 424 (O113:Hnd)	-	+	+	+	-
ED 99 (O120:H19)	-	+	+	-	+
ED 186 (O48:H21)	-	+	-	-	+
ED 97 (O91:H-)	-	+	-	+	-

*nd: non determinato

DISCUSSIONE

In questo lavoro descriviamo per la prima volta la presenza dei geni codificanti per la citotossina Subtilasi in ceppi VT-negativi, confermando la sua citossicità per le cellule Vero. L'analisi di sequenza ha evidenziato un'omologia nucleotidica tra i geni *subA* e *subB* del ceppo ED 591 pari al 90% con i geni corrispondenti presenti sul pO113 del ceppo 98NK2. Saggiando 61 ceppi VTEC abbiamo riscontrato la presenza dei geni *subAB* in cinque ceppi LEE-negativi, in accordo con quanto riportato in precedenza (2, 5). Due dei cinque ceppi VTEC che possedevano i geni *subAB* presentavano anche il gene *saa* (7), descritto nel plasmide pO113, spesso trovato in associazione ai geni codificanti la citotossina Subtilasi nei ceppi VTEC (2, 5). I ceppi ED 32 ed ED 591 e tre degli isolati VTEC *subAB*-positivi non producevano tale adesina ed invece contenevano il gene *tia* (3), associato fisicamente ai geni *subAB*. Questi risultati indicano un diverso arrangiamento del locus *subAB* in questi cinque ceppi rispetto a quanto descritto finora, e suggeriscono l'ipotesi che questa regione di DNA possa costituire una putativa PAI. Questa ipotesi è rafforzata anche dall'analisi del contenuto medio in GC di questa regione (48,4%), che nel ceppo ED 591 risulta essere più basso di quello medio stimato per gli *E. coli* K12. Ulteriori studi saranno volti alla conferma di questa ipotesi e alla caratterizzazione della putativa PAI che porta i geni *subAB* negli isolati positivi per il gene *tia*.

Bibliografia

1. Caprioli A, Luzzi I, Rosmini F et al. Hemolytic-uremic syndrome and Vero cytotoxinproducing *Escherichia coli* infection in Italy. J Infect Dis 1992;166:154-8..
2. Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Dos Santos LF et al. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. FEMS Microbiol Lett 2007; 274:329-34
3. Fleckenstein JM, Kopecko DJ, Warren RL, Elsinghorst EA. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1996; 64:2256-65.
4. Löfling JC, Paton AW, Varki NM, Paton JC, Varki A. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome. Kidney Int. 2009 Jul;76(2):140-4. Epub 2009 Apr 22.
5. Paton AW, Paton JC. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. J Clin Microbiol 2005; 43:2944-7.
6. Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic Escherichia coli. J Exp Med 2004; 200:35-46.
7. Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun 2001; 69:6999-7009.

VACCINI STABULOGENI IN ACQUACOLTURA: PRODUZIONE E CONTROLLI DI QUALITA'

Minardi D., Goria M., Pavoletti E., Giorgi I., Beltrame R., Arsieni P., Righetti M., Saragaglia C., Prearo M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino.

Key words: Vaccino stabulogeno, *Lactococcus garvieae*, Acquacoltura.

INTRODUZIONE

La richiesta mondiale di alimenti contenenti proteine di alta qualità, ha stimolato una rapida crescita dell'acquacoltura intensiva, portando alla nascita di numerosi problemi sanitari legati alla alta densità di allevamento, al decadimento della qualità dell'acqua, alle diete inadeguate, alla manipolazione dei soggetti e al controllo delle malattie. La comparsa di una malattia in allevamento oltre ad essere una limitazione allo sviluppo del settore ittico, è anche un peso economico che grava sul produttore, il quale in generale, può scegliere due vie d'intervento: terapia antibiotica e trattamento degli animali o uccisione e distruzione degli animali infetti, disinfezione dell'allevamento e ripopolamento con soggetti non infetti. Per quanto riguarda l'utilizzo di antibiotici e chemioterapici in acquacoltura, i problemi emersi nel corso degli anni riguardano: il fenomeno dell'antibiotico-resistenza acquisita da parte di specie batteriche; la mancanza di una eradicazione della malattia nell'allevamento; la temporaneità dell'effetto dell'antibiotico o del chemioterapico; la presenza di residui nelle carni che costituisce un problema di salute pubblica; l'inefficacia dei trattamenti terapeutici contro le malattie virali (5; 6).

Un altro metodo in continuo sviluppo, alternativo all'uso di chemioterapici e antibiotici per la prevenzione delle malattie nei pesci è la vaccinazione. La prima segnalazione relativa ad un tentativo di immunizzare i pesci mediante l'impiego di un vaccino risale al 1942 ad opera di Duff (2), il quale cercò di immunizzare *Oncorhynchus clarkii clarkii* contro la Foruncolosi tramite vaccinazione orale. Successivamente, la sperimentazione di vaccini si è sviluppata in modo notevole e per quanto riguarda l'Italia ha portato alla produzione, registrazione e commercializzazione di due vaccini spenti contro *Yersinia ruckeri* (Bocca Rossa) e *Vibrio anguillarum* (Vibriosi). A questo proposito è importante sottolineare che esistono altri vaccini utilizzabili in acquacoltura, i vaccini stabulogeni (6). Questi vaccini sono prodotti dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali previa autorizzazione del Ministero della Salute e sotto parere favorevole dell'Istituto Superiore di Sanità. Sono regolamentati dal D.M. 17 marzo 1994 n. 287 (1), non sono registrati come i prodotti farmacologici e gli altri vaccini e possono essere usati solo in presenza di patologie gravi e persistenti. Inoltre essi sono preparati su richiesta del veterinario curante, dopo diagnosi clinica e di laboratorio con lo specifico ceppo isolato dalla singola azienda. Essendo inoltre stabulogeni, in altre parole "isolati da stalla" non possono essere utilizzati per altri allevamenti, ma solo per quello nel quale è avvenuto l'isolamento. Attualmente, è autorizzato il vaccino spento contro la Lattococcosi ittica sostenuta da *Lactococcus garvieae* e prodotto dagli IIZZSS di Torino, di Brescia e di Legnaro (PD).

La vaccinazione, rispetto l'uso di antibiotici e chemioterapici, presenta numerosi vantaggi sia per l'allevatore che per il consumatore quali: il controllo di patologie gravi e ricorrenti in alternativa ai metodi di eradicazione diretta, la riduzione dell'impatto ambientale, l'eliminazione della presenza di residui nei prodotti ittici d'acquacoltura. La vaccinazione degli animali non deve in ogni modo essere considerata come una panacea: in sinergia con rigide norme igieniche e sanitarie, con la profilassi diretta e l'eventuale impiego mirato di chiemioterapici ed antibiotici, è uno degli elementi principiali per la prevenzione delle malattie (6). Si ritiene quindi d'importanza rilevante una produzione corretta e di qualità di vaccini stabulogeni efficaci ed esenti da rischi per l'allevatore, quali mortalità dovute ad una scorretta preparazione del vaccino.

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere le procedure di preparazione ed i controlli di qualità messi in atto per la produzione di vaccini stabulogeni per l'acquacoltura.

MATERIALI E METODI

Nel marzo 2009 sono giunti al Laboratorio Specialistico di Ittiopatologia di Torino 10 esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) provenienti da un allevamento del Nord Italia che presentava elevata mortalità e sintomatologia caratteristica.

Seguendo Procedure Operative Standard accreditate, sono stati eseguiti gli esami anatomopatologico e colturale. L'esame colturale prevede la semina da rene su piastre di Agar Sangue ed incubazione a 22 ± 2°C per 24-36 ore.

Dalle piastre sulle quali si è evidenziata crescita microbica, si è proceduto, mediante striscio su vetrino e colorazione di Gram, test della catalasi, tipizzazione con Api-20 STREP (Bio-Mérieux, France), all'identificazione del genere e specie del germe (*Lactococcus garvieae*). Da questo isolamento, il veterinario aziendale ha richiesto la produzione di un vaccino stabulogeno spento.

Per tale motivo le colonie di *L. garvieae* isolate, sono state amplificate per la produzione del vaccino, tramite preparazione di un master seed, allestendo bottiglie sterili contenenti 100 ml di terreno TSB liquido (Difco) e colonie del ceppo batterico isolato. Il tutto è stato incubato a 22 ± 2°C per 18-24 ore.

Successivamente la quantità utile di TSB per la produzione del lotto vaccinale richiesto, è stata messa in un biofermentatore, dove è stato innestato il master seed precedentemente preparato. Il tutto è stato mantenuto in agitazione costante per 24-36 ore a temperatura ambiente (24-28°C). In seguito, sono stati prelevati 10 ml di brodocoltura per il controllo microbiologico della purezza del vaccino e per la conta batterica. Il controllo di purezza è effettuato mediante semina su Agar Sangue ed identificazione batterica; la conta batterica è stata effettuata mediante semina su terreni selettivi (Slanetz-Bartley,), utilizzando diluizioni scalari.

Il lotto vaccinale è stato inattivato tramite l'aggiunta di aldeide formica al 40% in ragione dello 0,4% v/v e posto ad incubare per 24 ore a temperatura ambiente. Successivamente sono stati allestiti i controlli d'inattivazione del vaccino con l'utilizzo di due provette di TSB, una provetta di AGN e una provetta di THIO, posti ad incubare in cella termostatica a 37 ± 2°C e controllati giornalmente per sette giorni consecutivi.

Una volta verificata l'inattivazione della soluzione vaccinale, si è poi proceduto al lavaggio e alla concentrazione del vaccino tramite centrifugazione e lavaggio con PBS sterile pH 7,2 per tre volte. Prima del confezionamento è stato condotto un ulteriore controllo di sterilità mediante la stessa procedura vista per il controllo di inattivazione.

Il confezionamento è stato allestito mediante la risospensione della biomassa (in ragione di 30g/l) in PBS sterile pH 7,2, successivamente imbottigliata in flaconi sterili, sigillati con

tappi in gomma sterili e ghiere in alluminio. Su un campione rappresentativo della produzione è stato eseguito un ulteriore controllo di sterilità.
Sono stati inoltre prelevati 5 ml di lotto vaccinale per il controllo dell'assenza di tossicità anomale. A questo scopo 10 trote di 100-200 g. sono state inoculate con 0,2 ml/capo di vaccino; queste sono state sottoposte a controllo giornaliero per 7 giorni. Al termine di questo periodo, i soggetti sono stati soppressi tramite sedazione profonda con MS-222 e successiva spinalizzazione per il controllo anatomopatologico.
Dopo che tutti i controlli hanno dato esito favorevole, si è proceduto all'etichettatura del prodotto ed invio al veterinario richiedente.

RISULTATI

La storia clinica dell'azienda ed i risultati ottenuti dall'esame anatomopatologico (presenza di esoftalmo bilaterale, cheratite, melanosi, congestione cerebrale, idropericardio, splenomegalia, emorragie al fegato e alle seriose) hanno condotto alla diagnosi presuntiva di Lattococcosi ittica, malattia batterica sostenuta da *Lactococcus garvieae*, confermata successivamente dalle prove colturali, fenotipiche e biochimiche.
A questo punto si è proceduto alla preparazione del vaccino stabulogeno, mediante allestimento del master seed e successiva fermentazione. Il successivo controllo della purezza è risultato positivo, indicando che la specie batterica presente nel lotto considerato era *L. garvieae*. Il risultato ottenuto dalla conta batterica ha permesso di evidenziare una concentrazione di 10^9 UFC/ml.
Dopo il trattamento con formalina, il controllo d'inattivazione è risultato conforme, indicando che il lotto vaccinale è stato inattivato totalmente.
I successivi controlli di sterilità, effettuati rispettivamente dopo il lavaggio e dopo l'imbottigliamento del lotto vaccinale sono risultati anch'essi conformi, indicando che non vi è stata contaminazione durante le operazioni.
Il controllo dell'assenza di tossicità anomala del vaccino in soggetti vivi ha anch'esso dato esito positivo; non si è infatti registrata mortalità durante il periodo fissato per l'osservazione. Inoltre all'esame anatomopatologico i soggetti non hanno presentato lesioni sospette.

DISCUSSIONE

La Lattococcosi è una delle patologie iperacute-acute più diffuse nella troticoltura italiana di pianura e può causare perdite di circa 80-90% soggetti/anno. Si manifesta a temperature superiori di 15°C ed è quindi presente sul territorio dall'inizio della primavera fino ad autunno inoltrato. Colpisce prevalentemente soggetti adulti e subadulti di taglia superiore ai 20 g. e presenta una diffusione cosmopolita (Nord-America, Australia, Asia, Sudafrica ed Europa) manifestandosi sia in specie d'acqua dolce, sia in specie marine. Dall'isolamento di vari ceppi di *Lactococcus garvieae* in tutto il mondo è emerso che, mentre l'omologia genetica è superiore al 90%, la diversificazione del fenotipo è molto alta e possono essere distinti almeno 13 biogruppi tra i vari ceppi. Inoltre, nel 1999, grazie all'indagine epidemiologica di Eldar *et al*. (4), tramite l'utilizzo di RFLP *ribotyping* è stato possibile dimostrare che le evoluzioni dei ceppi italiani e spagnoli, hanno seguito dei percorsi autonomi, portando alla formazione di ceppi stabili fenotipicamente, genotipicamente e sierologicamente, mentre i ceppi francesi hanno mantenuto un profilo eterogeneo (3). Considerando quindi la diversità fenotipica, genotipica e sierologica dei diversi ceppi, appare importante utilizzare per la situazione italiana vaccini stabulogeni, sviluppati da ceppi autoctoni. Inoltre è stata dimostrata una scarsa efficacia dei vaccini sperimentali provenienti da ditte europee preparati con ceppi diversi da quelli presenti sul nostro territorio.
Si ritiene quindi d'importanza rilevante una produzione corretta e di qualità di vaccini stabulogeni efficaci, preparati con ceppi presenti esclusivamente sul territorio oggetto dello studio.

BIBLIOGRAFIA

1. D. M. 17 marzo 1994, n. 287. Regolamento recante norme sulla produzione, l'impiego ed il controllo dei medicinali veterinari immunologici inattivati, aventi caratteristiche di vaccini stabulogeni ed autovaccini. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale n. 111 del 14-5-1994*.

2. Duff, D.C.B. (1942). The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *J. Immunol.*, 44: 87-94.

3. Eldar A. (2004). *Lactococcus garvieae* epidemiology. Tavola Rotonda "Infezioni da cocchi Gram positivi in piscicoltura". *XI Convegno Società Italiana Patologia Ittica (SIPI), Finale Ligure (Sv)* – 8 ottobre 2004: 42.

4. Eldar A., Goria M., Ghittino C., Zlotkin A., Bercovier H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3: 1005-1008.

5. Giorgetti G. (2000). Vaccinazione e immunologia dei pesci: una problematica sempre più attuale. *Associazione Piscicoltori Italiani Bollettino Web.*

6. Prearo M. (2007). Igiene zootecnica: pratiche gestionali per un'acquacoltura sostenibile. *Ittiopatologia*, 4, 1: 19-40.

SUMMARY

Lactococcosis is the major fish pathology of trout farms in plains of Italy that is caused by *Lactococcus garvieae*. This bacterium is cosmopolitan and affects fresh water fish and marine fish. Different strains of *L. garvieae* have been isolated from all the world form a genetically homogeneous group, but not phenotipically and serologically. For this reason it is important to use autologous vaccines, developed from native strains, and produced with a corrects and certificates methods.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EQUINE ROTAVIRUS STRAINS FROM DIARRHEIC FOALS IN NORTHERN ITALY

Monini M.[1], Biasin A.[1], Valentini S.[2], Cattoli G.[3], Ruggeri F.M.[1]

[1]Department of Veterinary public health & Food safety. Istituto Superiore di Sanità, Rome - Italy
[2]Freelance Veterinarian, Italy
[3]OIE/FAO Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, Istituto Zooprofilattico Sper.le delle Venezie, Legnaro, PD, Italy.

Key words: Rotavirus; Diarrhoea; Horse

SUMMARY
Rotaviruses, the major etiological agents of acute viral gastroenteritis in children and domestic animals, are classified into seven antigenically distinct groups (A to G) based on the group antigen VP6. External capsid proteins VP4 and VP7 allow the dual rotavirus classification into P (protease-sensitive) and G (glycoprotein) genotypes. Equine Group A rotaviruses (GARVs) cause high morbidity and mortality in foals <3 months-old, resulting in severe economic losses.
In this study, we investigated rotavirus diarrhea spread in an equine farm near Venezia, involving foals during two consecutive winter seasons. Analysis of the VP7/VP4 diversity of the circulating equine viruses and studies on strains replacement are important for better understanding vaccine efficacies.

INTRODUZIONE
I rotavirus di gruppo A sono riconosciuti come una delle maggiori cause di gastroenterite acuta negli individui giovani di molte specie animali (3). Negli allevamenti, la diarrea da rotavirus equini di gruppo A (GARVs), rappresenta un ingente danno economico dovuto all'elevata morbosità e mortalità della patologia nei puledri neonati (1).
La classificazione dei rotavirus si basa su un sistema binario in cui si riconoscono distinti sierotipi e genotipi delle proteine capsidiche VP7 e VP4. Attualmente la genotipizzazione tramite reverse-transcription (RT) dei frammenti genici codificanti per queste due proteine e successiva semi-nested-PCR, utilizzando primers genotipo-specifici, è ampiamente impiegata negli studi di epidemiologia. Rotavirus equini con diversi genotipi G e P sono stati riscontrati diffusamente in molte regioni del mondo. Ad oggi, tramite caratterizzazione molecolare, sono stati identificati 19 genotipi per la VP7 (G) e 27 genotipi per la VP4 (P), alcuni dei quali sono condivisi tra animali e uomo (1, 9). Rotavirus con genotipo G3, G14 e G13, in associazione con i tipi P[12] e P[18], sono comunemente ritrovati nei giovani puledri, anche se sono stati riscontrati in modo sporadico ceppi appartenenti ai tipi G5, G8, G10 (1, 2, 4, 10). La sorveglianza molecolare dei ceppi di rotavirus circolanti negli allevamenti di una specifica regione consente di monitorare la possibile insorgenza di ceppi nuovi o inusuali al fine di migliorare i programmi di vaccinazione ed evidenziare i rischi di possibile trasmissione zoonotica.
In questo lavoro sono stati determinati i genotipi G e P di rotavirus di gruppo A circolanti in un allevamento di cavalli da corsa vicino Venezia campionati durante la primavera di quest'anno allo scopo di chiarire l'insorgenza della gastroenterite da rotavirus nei puledri neonati e di studiare la variabilità genetica e antigenica dei virus circolanti nell'allevamento.
L'infezione da GARV apparve per la prima volta nell'allevamento tra Gennaio e Febbraio 2008 per poi scomparire nella stagione calda. A Marzo 2009 i puledri neonati hanno sviluppato nuovamente l'infezione generalmente entro il 10° giorno di vita mostrando diarrea profusa, deidratazione, febbre e depressione. Le fattrici risultavano invece asintomatiche.

MATERIALI E METODI
Un totale di 52 campioni fecali è stato raccolto durante la stagione primaverile 2009 in un allevamento di cavalli da corsa vicino Venezia da puledri di circa 10 giorni di età che presentavano sintomi enterici conclamati e dalle loro fattrici. In seguito alla conferma in alcuni campioni della presenza di rotavirus tramite microscopia elettronica (EM) si è proceduto all'estrazione dell'RNA virale. Sono state preparate sospensioni fecali al 10% vol/vol in ddH_2O. A partire da 140 µl di questa sospensione è stata effettuata l'estrazione dell'RNA virale utilizzando un kit commerciale (QIAamp RNA Mini kit, Qiagen) conservando i campioni a -80°C. Per la tipizzazione G e P è stato utilizzato, con alcune modifiche, il protocollo originale descritto da Gouvea (6, 7, 8) e Gentsch (5). Per l'amplificazione del gene codificante per la proteina VP7 (1,062 bp) 5 µl dell'RNA virale sono stati denaturati (97°C, 5 min) in presenza della coppia di primers Beg9-End9 (Tab. 1); i primers Con2-Con3 (Tab. 1) sono stati utilizzati per amplificare una specifica regione di 876 bp nel gene per la proteina VP4. La trascrizione inversa (RT) e la prima PCR di amplificazione sono state eseguite in un formato one-tube (Invitrogen one-step Superscript). Un microlitro dei prodotti ottenuti diluiti 1:100 in H_2O è stato usato come templato per la seconda reazione di amplificazione tramite PCR. I primers genotipo-specifici utilizzati nelle reazioni di semi-nested-PCR sono descritti in tabella 1. I prodotti ottenuti nella reazione di semi-nested PCR sono stati successivamente purificati (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) e sequenziati (sequenziatore ABI, modello ABI3730XL, Applied Biosystems).L'analisi filogenetica delle sequenze ottenute è stata effettuata con il software DNASIS Max 2.0 e il dendrogramma è stato costruito utilizzando il metodo UPGMA con il software Bionumerics (Applied Maths, Belgio).

RISULTATI
Un totale di 52 campioni prelevati da puledri neonati con diarrea e dalle loro fattrici sono stati esaminati per la presenza di rotavirus di gruppo A tramite RT-PCR sui geni per la VP7 e la VP4. I genotipi G e P di questi campioni sono stati determinati mediante semi-*nested*-PCR in base ai differenti *patterns* di migrazione dei prodotti di amplificazione (Tab. 1). Il genotipo G è stato determinato in 14 campioni (27%) che sono risultati tutti appartenere al tipo G14.
Il genotipo P è stato determinato in 12 campioni (23%). La caratterizzazione del genotipo P ha mostrato la presenza del solo tipo P[12] mentre il 3.8% dei campioni è rimasto non tipizzato per il genotipo P.

Tabella 1. Primers utilizzati per la genotipizzazione dei rotavirus equini.

Primer G-tipo	Senso	Posizione*	Prodotto (bp)*	Ref.
RT-PCR				
Beg9	+	1-28	1062	6
End9	-	1062-1036		
Nested-PCR				
G3E	+	689-709	374	1, 10
G5(FT5)	-	779-760	780	8
G8 (HT8)	-	273-256	274	8
G10(ET10)	-	714-697	715	8
G13F	+	742-765	321	4, 10
G14D	+	481-498	582	1, 10
Primer P-tipo	**Senso**	**Posizione***	**Prodotto (bp)***	**Ref.**
RT-PCR				
Con2	-	887-868	876	5
Con3	+	11-32		
Nested-PCR				
P1	+	269-289	622	7
P7	+	389-412	502	7
P[12]-1R	-	488–469	478	1, 4
P[18]-1R	-	463–444	452	1, 4

*Come riportato nelle referenze corrispondenti.

I campioni risultati negativi alla genotipizzazione sono stati sottoposti ad amplificazione tramite semi-nested-PCR utilizzando i primers corrispondenti ai genotipi sporadicamente trovati negli equini (G5, G8 G10 e P[1], P[7] Tab. 1); nessuno di questi ha dato risultato positivo.
I campioni positivi sono stati tutti sottoposti a sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate in GenBank, tramite l'utilizzo del programma di analisi degli allineamenti BLAST. Il confronto delle sequenze ha mostrato il coinvolgimento di un unico ceppo virale che presenta una stretta relazione con sequenze del gene VP7 dei ceppi equini G14 presenti in GenBank (Fig. 1).

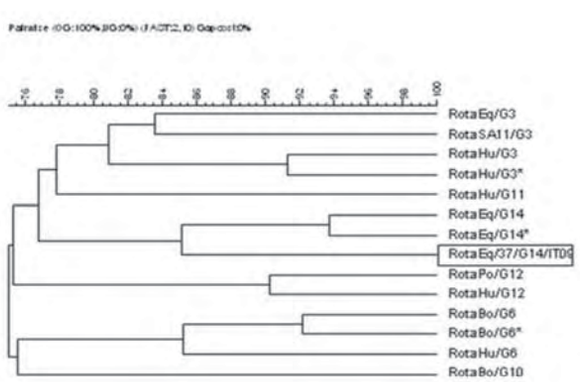


Figura 1. Dendrogramma basato sulle sequenze della regione VP7.

DISCUSSIONE

La sorveglianza e lo studio tramite caratterizzazione molecolare dei rotavirus di gruppo A sono strumenti utili per monitorare la diversità e variabilità nel tempo dei ceppi prevalenti. La RT-PCR si è dimostrata una metodica affidabile per individuare tipi comuni di rotavirus, ma il metodo si dimostra meno efficiente nel caso di genotipi di rotavirus nuovi o non comuni e in presenza di infezioni miste. E' noto che la maggior parte dei ceppi equini di rotavirus appartengono ai tipi G3, G14 in associazione al genotipo P[12]. Da lavori precedenti sulla caratterizzazione molecolare di ceppi di rotavirus isolati negli equini (1, 2, 4, 10) risulta che la combinazione G3P[12] sia la più diffusa, mentre in questo lavoro sono stati isolati solo ceppi G14. Questi cambiamenti nella prevalenza dei ceppi potrebbero essere dovuti sia a variazioni nell'immunità sviluppata dagli animali verso specifici sierotipi di rotavirus, sia ad altre caratteristiche in grado di rendere un ceppo virale più adatto alla propagazione all'interno di una comunità. La caratterizzazione molecolare dei ceppi di rotavirus equini circolanti è essenziale per l'acquisizione di dati epidemiologici e allo stesso tempo rappresenta un utile strumento che permette di monitorare i ceppi prevalenti, consentendo un aggiornamento costante dei programmi di vaccinazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Collins P.J., Cullinane A., Martella V., O'Shea H., 2008. Molecular Characterization of Equine Rotavirus in Ireland J. Clin. Microbiol. 46(10), 3346–3354
2. Elschnera M., Schraderb C., Hotzela H., Prudloa J., Sachsea K., Eichhornc W., Herbstd W., Ottoa P., 2005. Isolation and molecular characterisation of equine rotaviruses from Germany. Vet. Microbiol. 105 123–129
3. Estes, M.K, and Kapikian, A.Z., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., (Eds.), Fields Virology, 5th ed., vol. 2 Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 1917–1958.
4. Fukai K., Saito T., Fukuda O., Hagiwara A., Inoue K., Sato M., 2006. Molecular characterisation of equine group A rotavirus, Nasuno, isolated in Tochigi Prefecture, Japan. Vet. J. 172, 369–373.
5. Gentsch, J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., Das B.K., Bhan M.K., 1992. Identification of group rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30, 1365–1373.
6. Gouvea, V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., Fang Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 28, 276–282.
7. Gouvea, V., Santos N., Timenetsky M.C., 1994a. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 1333–1337.
8. Gouvea, V. Santos N., Timenetsky M.C., 1994b. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 1338–1340.
9. Martella V., Ciarlet M., Bányai K., Lorusso E., Arista S., Lavazza A., Pezzotti G., Decaro N., Cavalli A., Lucente M. S., Corrente M., Elia G., Camero M., Tempesta M., Buonavoglia C., 2007. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in italian swine herds. J. Clin. Microbiol. 45(2), 577-580
10. Tsunemitsu, H., Imagawa H., Togo M., Shouji T., Kawashima K., Horino R., Imai K., Nishimori T., Tagaki M., Higuchi T., 2001. Predominance of G3B and G14 equine group A rotavirus of a single VP4 serotype in Japan. Arch. Virol. 146, 1949–1962.

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI PRRS: VALIDAZIONE DI UNA METODICA RT-NESTED -PCR E MONITORAGGIO DIAGNOSTICO NEGLI ANNI 2008-2009

[1]Monnier M., [1]Callipo M.R., [1]Lai J., [1] Nappi R., [1]Lacerenza D., [1]Zoppi S., [1]Dondo A., [1]Masoero L., [2]Tursi M., [1]Goria M.
[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*
[2]*Facoltà di Medicina Veterinaria-Università degli Studi di Torino*

Key Words: PRRS, RT-Nested PCR, validazione

SUMMARY
RT-Nested PCR test for the detection of PRRSv (European strain) in biological samples was subjected to validation with the purpose to realize a monitoring plan for the detection of PRRSv in Piedmont. Validation results showed that the test could be considered a valid and robust tool for diagnosis PRRS due to PRRSv European strain. 301 samples were analyzed for the detection of PRRSv in Piedmont, of which 36 were resulted positive to PRRSv European strain.

INTRODUZIONE
Il virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRSv), appartiene alla famiglia *Arteriviridae,* ordine *Nidovirales*, genere *Arterivirus* dal quale è stato isolato per la prima volta nel 1991 il ceppo europeo *Lelystaw*
La PRRS è tra le malattie a maggiore impatto economico nella produzione suinicola in quanto negli allevamenti colpiti, il virus si diffonde abbastanza rapidamente provocando una forma respiratoria grave caratterizzata da un'elevata morbilità e variabile mortalità. Negli allevamenti la conseguenza principale della forma respiratoria è la diminuzione della capacità d'ingrasso. Oltre alla forma respiratoria, la malattia può manifestarsi anche con disturbi della fertilità che può interessare fino al 50% delle scrofe dell'allevamento. Tali disturbi possono comparire da tre settimane a molti mesi dall'infezione e consistono in aborti e in nascite di suinetti morti o talmente gracili da essere destinati a morire entro pochi giorni. Si assiste inoltre a una difficoltà di fecondazione delle scrofe.
Gli animali tendono ad infettarsi per via aerea, oro-fecale, genitale ma anche attraverso vettori meccanici o biologici.
I virus dopo essere entrati nel suino, si moltiplicano prima nelle cellule dei polmoni e delle tonsille, ed infine si disseminano in tutto l'organismo. Di conseguenza il virus tende a diffondersi facilmente nell'ambiente attraverso le secrezioni nasali, gli escrementi, l'urina, lo sperma, la placenta e i feti nati morti di animali infetti. Quindi nelle aziende la malattia si propaga in seguito al contatto con materiale infetto o per inalazione di particelle disperse da quest'ultimo. Il virus può rimanere infettivo a lungo in animali che sono stati contagiati ed è per questo motivo che i suini apparentemente sani sono in grado di contagiare altri animali della stessa specie. Gli uccelli, gli insetti ma anche l'uomo possono veicolare il virus
La PRRS può essere rilevata attraverso una diagnosi clinica o di laboratorio. La diagnosi clinica si basa sull' osservazione della sintomatologia specifica dell'animale infetto (cianosi a livello di orecchie, ventre e zampe; palpebre tumefatte con secrezioni oculari), mentre la diagnosi di laboratorio si basa sull'impiego di diversi metodi diagnostici quali l'isolamento virale, la sieroneutralizzazione virale, l'immunoflurescenza indiretta, l'ELISA e la PCR. Il test ELISA è il metodo comunemente utilizzato per screening, tuttavia la bontà dei risultati sono fortemente influenzati dallo sierostato del campione. Per questo motivo al test ELISA si tende ad affiancare altri metodi, quali ad. es la PCR, che oltre ad essere un metodo estremamente sensibile, ha il vantaggio dell'identificazione diretta dl virus attraverso l'amplificazione di specifiche sequenze di acido nucleico.
Il presente studio ha avuto come obiettivo la validazione di metodo di analisi in RT-Nested PCR per l'identificazione del ceppo europeo di PRRSv, finalizzato alla realizzazione di un piano di monitoraggio per la ricerca dello stesso negli allevamenti suinicoli in Piemonte.

MATERIALI E METODI

RT-NESTED PCR.
Il metodo si basa sul rilievo di un segmento della regione ORF7 del virus in cui sono stati disegnati, per il ceppo europeo, una coppia di primers interni (1) a quelli descritti da Persia *et al* (2). L'estrazione da tessuti e da liquidi biologici del RNA virale è stata eseguita in accordo alle istruzioni dei kit utilizzati (Qiagen; Macherey-Nagel) La retrotrascrizione e l'amplificazione I Step sono state eseguite in accordo con il metodo descritto da Persia *et al*. (2,3), mentre per il II Step le condizioni di reazione seguono il protocollo descritto precedentemente da Monnier *et al* (1).

VALIDAZIONE DEL METODO
La validazione del metodo per l'estrazione e la ricerca di RNA del virus della PRRS in siero e tessuti di suino ha previsto lo studio e la valutazione dei seguenti parametri: sensibilità e specificità analitica, precisione, robustezza, stabilità, accuratezza. Di seguito per ciascuno di essi viene descritta la tipologia e la consistenza dei campioni *ad hoc* selezionati.

Estrazione dell'RNA virale
Precisione – E' stata stimata attraverso la valutazione dei risultati ottenuti con l'applicazione della prova RT-Nested PCR al prodotto della fase estrattiva eseguita sui controlli di estrazione positivi (ceppo americano e ceppo europeo) e negativo puntualmente introdotti ad ogni ciclo di analisi attraverso 10 cicli di analisi.
Stabilità - Si considera direttamente collegata al rispetto delle condizioni di conservazione e del periodo di validità dei reagenti indicati dal produttore.
Robustezza - Si considera correlata al rispetto delle condizioni di impiego indicate dalla ditta produttrice (ad es. dispensazione del volumi dei reagenti, tempi e temperature di incubazione, modalità conservazione dei reagenti).

Retrotrascrizione e Amplificazione di RNA virale
Sensibilità analitica/L.O.D. (limite di rilevazione) – Per ottenere le quantità di DNA necessario alla determinazione del LOD della reazione di Nested PCR sono state allestite in parallelo due serie distinte di 10 diluizioni di cDNA target specifico clonato a partire da cDNA ottenuto per retrotrascrizione e prima amplificazione dell'RNA estratto da una sospensione di PRRSv - ceppo europeo. Tali diluizioni hanno prodotto una scala di concentrazioni di cDNA con le quali è stato possibile impiegare per singola reazione e in condizioni di ripetibilità e riproducibilità intermedia (due replicati per ciascuna delle due serie) quantità di cDNA comprese tra 100 ng e $3,2*10^{-10}$ng.
La simulazione dello status operativo è stata creata aggiungendo una quantità media di DNA esogeno (240 ng) in ogni tubo di reazione insieme a cDNA target in quantità pari al L.O.D., attraverso l'esecuzione della prova eseguita in condizioni di ripetibilità e riproducibilità intralaboratorio.
Specificità analitica - Le prove sono state eseguite su RNA non target estratto da Trasmissibile GastroEntheritis of Swine virus, Canine Distemper virus, PI3, Viral Respyratory Syncytial Bovine virus, Norovirus e Hepatitis A virus.

Robustezza - Le prove sono state allestite sia su cDNA target, sia successivamente su RNA generato dalla trascrizione *in vitro,* rispettivamente alle concentrazioni corrispondenti al L.O.D. e a L.O.D. 5x. Per ciascuna serie di campioni, la prova è stata eseguita in duplicato in condizioni di variabilità dei seguenti parametri: enzima *Taq* DNA Polimerasi (la prova è stata eseguita utilizzando quattro differenti marche di *Taq* DNA Polimerasi "Hot Start Type") e tre differenti temperature di *annealing* dei primer (T_m ± 2°C).

Stabilità – Per la valutazione della stabilità è stato considerato il tempo di validità dei primers specifici in soluzione stock (100 µM) e in soluzione d'uso (25 e 20µM) alle condizioni di conservazione.

Accuratezza - Per la valutazione della specificità diagnostica sono stati considerati 30 campioni risultati negativi alle indagini sierologiche.

Per la valutazione della sensibilità diagnostica sono stati considerati 10 campioni di organi prelevati da animali con quadro clinico e anatomo patologico riconducibile a PRRS, appositamente selezionati da allevamenti con indirizzo anamnestico specifico.

Precisione - Sono stati utilizzati quattro controlli di processo di cui due positivi,(costituiti rispettivamente da un pool di campioni provenienti da animali con quadro clinico e anatomo patologico riconducibile a PRRS, precedentemente risultati positivi alla prova e cDNA ottenuto da RNA estratto dagli stessi e già testato per PRRSv) e due negativi (costituiti da un pool di tessuti negativi e da acqua ultrapura trattata con DEPC) .

Sono state eseguite n. 3 prove di retrotrascrizione ed amplificazione in condizioni di ripetibilità intermedia variando gli operatori addetti alle prove, e mantenendo stabili tutti gli altri parametri.

Al termine del processo di validazione è stata effettuata una prova partecipando al circuito interlaboratorio "Circuito Aqua" di diagnostica bovina e suina con metodiche biomolecolari.

CAMPIONAMENTO PER IL MONITORAGGIO DIAGNOSTICO

Per la ricerca del virus della PRRS, nel periodo che va dal 01/01/2008 al 30/06/2009 sono pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta n°301 campioni biologici prelevati da allevamenti suinicoli (Tabella 1) (243 relativi all'anno 2008 e 58 all'anno 2009).

Tabella 1. Campioni biologici suddivisi per tipologia di campione

Totali	Siero	Polmoni	Visceri	Linfonodi	Milza	Pool organi
301	264	32	2	1	1	1

RISULTATI E DISCUSSIONE

VALIDAZIONE DEL METODO

La metodica in RT Nested PCR per la determinazione di RNA del virus della PRRS soddisfa i criteri di specificità, stabilità e robustezza prefissati in origine: in particolare i primers si sono confermati specifici per amplificare esclusivamente un segmento di 153pb nella regione ORF7 del virus.

Le prove condotte per la determinazione del limite di rilevazione (L.O.D.) della RT Nested PCR hanno dimostrato una sensibilità analitica del metodo pari a 9000 copie genomiche del target specifico corrispondenti a $4*10^{-5}$ ng di cDNA plasmidico (plasmide + inserto).

La simulazione dello status operativo ha confermato il L.O.D. stimato (la prova non ha subito cali di efficienza).

La metodica utilizzata risponde perfettamente alle aspettative di specificità: è stato correttamente identificato l'RNA estratto da una sospensione virologica positiva per il ceppo europeo, mentre non sono stati generati ampliconi per gli altri RNA genomici estratti da 6 virus differenti.

Le prove di stabilità eseguite sui primers specifici, alla concentrazione d'uso (25 e 20 µM) e in soluzione stock (100 µM) rispettando le condizioni di conservazione, hanno dimostrato che, rispettivamente dopo sei mesi e dopo un anno dalla preparazione (tempi di validità delle soluzioni), la reazione si mantiene stabile.

La robustezza del metodo di prova valutata attraverso variazioni della temperatura di annealing dei primers e attraverso l'utilizzo di *Taq* DNA Polimerasi di differente fabbricazione si è dimostrata soddisfacente. Inoltre, le variazioni di preparazioni di enzima *Taq* DNA polimerasi di differenti produttori non hanno avuto ripercussioni sull'esito delle prove.

Le prove eseguite per la valutazione della precisione evidenziano un grado di accordo "molto buono" con K=1.

Relativamente all'accuratezza il metodo ha mostrato buoni valori di specificità e sensibilità.

Inoltre, la partecipazione al circuito interlaboratorio "Circuito Aqua" di diagnostica bovina e suina con metodiche biomolecolari ha dimostrato un accordo del 100%.

ATTIVITA' DIAGNOSTICA

Dei 301 campioni esaminati per la ricerca del virus della PRRS, 36 campioni sono risultati positivi, mentre 265 campioni sono risultati negativi. Dei 36 campioni risultati positivi all'analisi, 15 sono campioni di siero, 1 è un linfonodo, 1 deriva da un pool di organi, 19 sono campioni di polmone. In tabella 2 sono riportate rispettivamente le positività e la loro percentuale, suddivise per tipologia di campione rispetto al totale delle positività.

Tabella.2. Distribuzione del numero di campioni positivi e delle rispettive percentuali di positività secondo la tipologia di campione.

Totali	Siero	Polmoni	Linfonodi	Pool organi
36	15(42%)	19 (52%)	1 (3%)	1(3%)

I dati di validazione ottenuti dimostrano che il metodo può essere considerato un valido strumento da applicare alla diagnostica della PRRS.

Nel corso del piano di monitoraggio con l'applicazione del metodo RT-Nested PCR sono stati identificati 36 campioni positivi (14,81%) al virus della PRRS, ceppo europeo. La maggior parte delle positività si è ritrovata in campioni di polmone (52%) e di sangue (siero) (42%). Seguono poi con basse positività i linfonodi (3%) e un campione di pool di organi (3%).

Dai riscontri effettuati in campo si può affermare che tale metodica abbia contribuito ad aumentare il livello di garanzia correlato alle condizioni di biosicurezza individuate dai sanitari nelle strategie di controllo poste in essere negli allevamenti. Inoltre, data la percentuale di positività riscontrata, è necessario un costante e continuo monitoraggio per il controllo di una delle più insidiose patologie che affliggono l'allevamento suinicolo.

BIBLIOGRAFIA

1) Monnier M., Kobal F., Ghia C.A., Buonincontro G., Goria M. "Sindrome riproduttiva e respiratoria del suino: osservazioni preliminary per la ricerca del virus ceppo europeo nel siero mediante RT-Nested PCR" VII Congresso Nazionale SIDILV- Torino, 26-28 Ottobre 2005.
2) Persia D., Pacciarini M.L., Cordioli P. e Sala G. 2001. Evaluation of Three RT-PCR assays for the detection o porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples. Atti "X International symposium of veterinary laboratorydiagnosticians and OIE seminar on biotecnology. Salsomaggiore.
3) Oleksiewicz M.B., Botner A., Botner K.G., Madsen K.G., Storgaard T. 1998. Sensitive detection and typing porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. Vet. Microbiol. 64:7-22.

VALUTAZIONE DELLO STRESS DA TRASPORTO E DA ADATTAMENTO IN SUINI DA INGRASSO

Moscati L., Pela M., Antolini A., Sensi M., Battistacci L.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Key words: suini, acclimatamento ,sistema immunitario.

ABSTRACT: Some no specific immunity parameters, iron, zinc, and serum proteins were evaluated in a group of grower pigs to highlight their eventual stress of transport and acclimatization.The results confirm the hypothesis that a correct period of acclimatization is vital for an easier integration into the main herd.

INTRODUZIONE

La protezione degli animali durante il trasporto è disciplinata da un'ampia normativa a livello Europeo e Nazionale (Legge 12 aprile 1973, n. 222**,** Legge 28 aprile 1982, n. 224, Regolamento n. 1/2005 CEE). Tale regolamento introduce norme più restrittive applicabili al trasporto su lunghi percorsi di durata superiore alle otto ore. E' fatto divieto infatti, di trasportare animali molto giovani e riproduttrici nell'ultimo stadio di gravidanza e nella prima settimana dopo il parto. Relativamente ai mezzi di trasporto, è prevista l'implementazione di un'attrezzatura della migliore qualità che possa garantire, ai soggetti trasportati, un adeguato comfort. Grazie all'applicazione di queste norme, gli animali hanno la possibilità di giungere nel nuovo sito di allevamento, in condizioni sicuramente, meno critiche, rispetto a quanto accadeva in un recente passato. Ciò non di meno, il ristallo costituisce per ogni soggetto, appartenente a qualsiasi specie animale, un momento di particolare criticità. E' questo infatti il periodo in cui si verifica la sovrapposizione di varie dinamiche stressanti (trasporto, cambio di ambiente, rimescolamento, adattamento a cariche patogene diverse, ecc..). Vi è la necessità, quindi, di una attenta ed accurata gestione, da parte dell'uomo-allevatore, al fine di garantire agli animali di nuova introduzione, una pronta compensazione della situazione di stress, in maniera da ridurre così i tempi di recupero, ed ottimizzare la velocità di crescita. Scopo del presente lavoro è quello di mettere in evidenza in un allevamento, di suini da ingrasso il verificarsi della dinamica stressante, costituita dal ristallo e la valutazione della capacità di recupero di tali soggetti nel tempo attraverso la determinazione di alcuni parametri.

MATERIALI E METODI

Sono stati prelevati 30 campioni di sangue da animali provenienti dalla Germania al momento dello scarico dal camion in azienda (T0). Sono stati poi eseguiti, sugli stessi animali, ulteriori prelievi ad una settimana (T1), due settimane (T2), e ad un mese dall'arrivo (T3).
I campioni di sangue, prelevati dalla giugulare, sono stati refrigerati e recapitati al più presto in laboratorio; all'arrivo sono stati centrifugati a + 4°C per 20' a 3000 rpm e i sieri conservati a – 80°C fino al momento dell'esecuzione delle prove.

Sono stati valutati parametri d'immunità aspecifica (complemento, battericidia, lisozima), lo zinco, il ferro, l'aptoglobina, le proteine totali, e il ferogramma.
La titolazione del lisozima sierico è stata eseguita secondo la metodica di Osserman (5). I campioni di siero sono stati posti a contatto con una sospensione di Micrococcus Lysodeikticus, incorporato in un gel di agar. Dopo una incubazione a 37°C in camera umida per 18 ore, è stata effettuata la lettura, determinando con un calibro o con un righello la misura del diametro degli aloni. La concentrazione di lisozima, espressa in µg/ml, è proporzionale al diametro dell'anello di chiarificazione osservabile attorno al pozzetto e viene stabilita in base ad una curva standard ottenuta a seguito della incubazione di quantità note di lisozima.
La determinazione della battericidia sierica si esegue incubando, in camera umida a 37° C per 18 – 20 h, un ceppo di E. coli con il siero da saggiare e valutando poi quanto il siero sia stato in grado di inibire la crescita del E. coli. La crescita del germe viene valutata determinando la variazioni di densità ottica rispetto ad un ceppo di E. coli incubato solo con del terreno di coltura. Il risultato viene espresso come valore percentuale di capacità battericidica del siero in esame (2).
La titolazione del complemento si basa sulla quantificazione dell'attività litica del siero nei confronti delle emazie di montone sensibilizzate con emolisina (via classica di attivazione del complemento). La prova consiste nel mettere a contatto i sieri in esame diluiti con una miscela di globuli rossi di montone ed emolisina. La piastrina a 96 pozzetti contenente i sieri e la sospensione di globuli rossi viene incubata per 30 minuti a 37°C, quindi centrifugata per 2 minuti a 2000 rpm e 100µl di surnatante di ogni pozzetto vengono trasferiti in una piastra vuota. La piastra viene letta con lo spettrofotometro a λ 550 nm. I valori sono espressi come CH50(1).
Lo zinco, il ferro e le proteine totali sono stati determinati utilizzando un apparecchio Hitachi 704 e reagenti Sentinel. I valori dell'aptoglobina sono stati quantificati attraverso l'utilizzo di un kit commerciale (Tridelta) mentre le frazioni proteiche del siero con elettroforesi su acetato di cellulosa.
Analisi statistica: i dati ottenuti dalle analisi di laboratorio sono stati elaborati mediante ANOVA.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1.
Da essa si evidenzia come, nelle prime due settimane dall'arrivo, quasi tutti i parametri indichino una difficoltà di adattamento dell'animale alla nuova realtà di allevamento.
Il lisozima, che permette di conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitico macrofagico ed è indice di presenza di stati flogistici, tende ad aumentare, in concomitanza con probabili infezioni dovute al mescolamento di cariche microbiche diverse.
Al contrario il complemento libero, che fornisce dati sulla competenza immunitaria dell'ospite nei confronti dei patogeni ambientali, diminuisce in modo significativo, a voler testimoniare una situazione stressante che va acquisendo caratteristiche di cronicità.
L'aptoglobina, proteina di fase acuta positiva ed indice di processi infiammatori, aumenta nel tempo; al contrario l'albumina, proteina di fase acuta negativa, diminuisce (4, 6). A ulteriore supporto di uno stress da adattamento, si ha anche una diminuzione nel tempo dei valori di zinco e ferro. Zn aumenta la sintesi epatica di una metallotionina che lega questo microelemento in un distretto diverso dal plasma; Fe, subisce una sua ridistribuzione nell'organismo che lo devia dal circolo ematico ai tessuti (3). Quanto si osserva sembrerebbe, pertanto, trovare piena giustificazione in una risposta infiammatoria presente negli animali esaminati. Non bisogna dimenticare, inoltre, che lo Zn, partecipando a diversi processi biochimici ed immunologici, gioca un ruolo

importante nelle funzioni fisiologiche dell'organismo. Questo microelemento è importante nel catabolizzare i radicali liberi, serve a costruire la struttura dell'enzima citocromo ossidasi, funziona da cofattore dell'enzima superossidodismutasi. Inoltre, gioca un ruolo essenziale nella sintesi degli acidi nucleici e nello stabilizzare le membrane cellulari; nonché nell'aumentare la risposta immunitaria cellulare e le difese nei confronti di infezioni e neoplasie (3).
Dal tracciato elettroforetico si nota un aumento delle α globuline (di cui fanno parte le proteine di fase acuta) e delle γ globuline.
La battericidia sierica, che è il primo parametro di immunità aspecifica che si altera nel suino, tende invece a migliorare nel tempo pur non raggiungendo i valori di normalità (> 40%).
Ad un mese dall'arrivo (T3), tutti i soggetti mostrano una forte tendenza alla normalizzazione dei parametri in oggetto, testimoniato dai valori di battericidia sierica e del lisozima che progressivamente si avvicinano ai loro valori di normalità.
L'evento stressante appare non ancora completamente superato ed i livelli di complemento rilevati al T3, sembrano esserne buona testimonianza. Il rialzo dell'aptoglobina e delle γ globuline al T3 può essere ricondotto al forte abbassamento della temperatura ambientale, verificatosi nella settimana precedente il controllo, che ha causato "raffreddamento" degli animali e dato origine a qualche, seppur modesta, problematica respiratoria.

In conclusione, riteniamo che il ristallo costituisca un evento di particolare criticità per gli animali che non può essere ricondotto nell'ambito di parametri di certezza, ben definiti. Esso rappresenta una dinamica stressante che va gestita, da parte dell'allevatore, in relazione agli ambienti/ strutture di allevamento ed alla genetica utilizzata. La piena comprensione e la soddisfazione dei fabbisogni dei soggetti allevati, si ripercuoterà, positivamente sull'accorciamento del periodo di recupero e sullo stato sanitario dell'intera mandria.

BIBLIOGRAFIA

1. Barta V., Barta O., (1993) Testing of Haemolytic Complement and its components. In: Barta O., (ed.) Vet. Cl. Imm. Lab., Bar-Lab, Blacksburg, USA
2. Dorm W. et al. (1980). Arch. Exper. Vet. Med. 34,635-650
3. Kushner I., (1982) The phenomenon of the acute phase response. Annals New York Academy of Sciences. 39-48.
4. Murata H., Shimada N.,Yoshioka M.(2004) Current researchon acute phase proteins in veterinary diagnosis. An overview The Veterinary Journal 168 28-40
5. Osserman E.F (1966). J. Exp. Med. 124, 921- 952
6. Salamano G., Mellia E., Candiani D., Ingravalle F., Bruno R., Ru G., Doglione L. (2008) Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig –MAP durin a housing period following long distance transport in swine The Veterinary Journal 177 110-115

Tabella 1: Valori medi ± es ottenuti nei prelievi effettuati

	T0	T1	T2	T3
Battericidia	12,32 ±2,53 A	17,53 ±2,67 A	21,66 ±1,52 B	29,98±1,83 C
Lisozima	4,97 ±0,25 A	7,14± 0,40 B	6,5± 0,51 B	4,1±0,30 C
Complemento	87,74 ±2,51 A	86,77 ± 2,95 A	71,74 ± 3,13 B	75,83 ± 4,72
Aptoglobina	0,51±0,14	0,30 ±0,09 A	0,72±0,06 B	1,36 ±0,11 C
Zn	115,07±4,43 A	105,84±5,27	95,46±3,26 B	86 ± 5.22
Fe	26,70±1,67 a	22,41±1,34 b	22,37±1,86 b	19.1±2.11
Albumina	39,43±0,76 A	35,44±0,52 B	30,61±0,63 C	31.52±0.62
alfa	12,82±0,37 aA	11,24±0,84 bA	14,32±0,31 B	13.68±0.53 C
beta	17,04±0,60 a	19,60±1,04 bA	15,65±0,38 B	19.23±0.60
gamma	7,31±0,36 A	7,18±0,54 A	11,03±0,52 B	17.17±0.74 C

ABC P>0,001
ab P>0,05

INDAGINE SULLA PRESENZA DI MELAMINA IN CAMPIONI DI PRODOTTI ITTICI DI IMPORTAZIONE

Nardelli V., dell'Oro D., Decina I., [1]Palermo C., [1]Centonze D.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata - Foggia; [1] Dipartimento di Scienze Agroambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Facoltà di Agraria ,Università degli Studi di Foggia

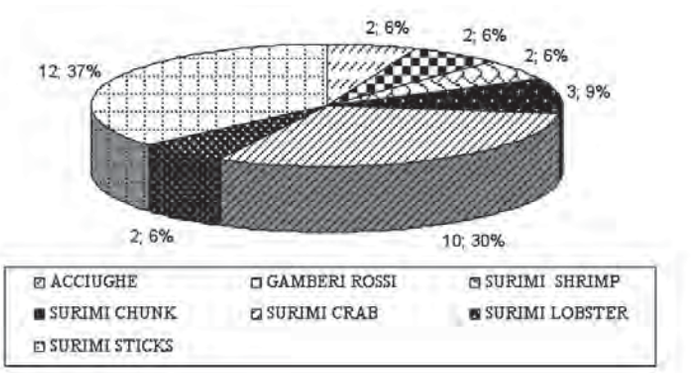
Key words: melamine, fish, GC/MS

ABSTRACT – Melamine is a synthetic nitrogenous heterocyclic compound, now currently used as illegal agent in food and animal feeds, to increase the protein content, therefore reducing the cost of the production. No national authorities has approved the melamine as a food additive. This compound damages strongly cells kidney, resulting in malfunction and giving severe poisonings. To detect the illegal use of melamine, a monitoring was carried out in 33 samples coming from China. The analytical method provides a reliable tool to enforce correct routine analysis.

INTRODUZIONE – La melamina è un composto eterociclico azotato di sintesi (1,3,5-triazina-2,4,6-triamina), utilizzato nell'industria della plastica, unitamente alla formaldeide, per la produzione di prodotti termoindurenti e per la formazione di resine melaminiche. Trattandosi di una molecola costituita per il 66% da atomi di azoto, la melamina trova impiego nel settore dei fertilizzanti ma si presta anche ad un uso illegale. Infatti, la valutazione del tenore proteico di un alimento si basa principalmente sulla misurazione dell'azoto totale e tale sostanza, ricca di azoto non proteico, permette di elevare il tenore apparente di proteine. La Commissione Europea non annovera la melamina tra gli additivi alimentari consentiti e pertanto ne vieta l'utilizzo. La molecola di per sé non è particolarmente tossica, ma una volta metabolizzata in vivo in presenza di acido cianurico, forma un prodotto insolubile che tende a cristallizzare ed ostruire i tubuli renali con potenziale arresto della formazione dell'urina, successivo blocco renale e possibile decesso. Nel Settembre del 2008, si è verificato un grave caso di frode alimentare in Cina sul latte destinato alla prima infanzia, che ha provocato il decesso per blocco renale acuto di alcuni lattanti e causato l'intossicazione di migliaia di persone. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) in questa occasione ha emesso un parere scientifico in merito al rischio per la salute pubblica, indicando come dose giornaliera tollerabile (TDI), una quantità cautelare di ingestione di melamina, eventualmente presente negli alimenti, di 0,5 mg/Kg di peso corporeo. Data l'incertezza esistente riguardo ai tempi necessari perché si produca un danno ai reni, l'EFSA ha usato un valore considerato protettivo e cautelativo anche in seguito ad esposizione per tutta la vita di un individuo, come nel caso del consumo ripetuto di prodotti contaminati. Inoltre, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha applicato, con entrata in vigore dal 14/10/2008, la Decisione 2008/798/CE secondo la quale si vieta l'importazione nella Comunità Europea di prodotti originari della Cina o da essa provenienti contenenti latte, prodotti lattieri, soia o prodotti a base di soia destinati all'alimentazione in particolare dei lattanti e dei bambini. Successivamente con ulteriore Nota N° 21504 del 30/10/08, a seguito del riscontro di melamina in uova di origine cinese, il Ministero ha suggerito, coinvolgendo i PIF e gli USMAF, di estendere le analisi ai mangimi per acquacoltura e prodotti d'acquacoltura, nonché ai prodotti della pesca trasformati contenenti anche altri ingredienti di origine animale e vegetale (surimi), carni e prodotti a base di carne di pollame. I metodi analitici che attualmente sono disponibili per la rivelazione e la quantificazione della melamina in alimenti e mangimi si basano su tecniche cromatografiche quali la GC e la LC accoppiate a tecniche di spettrometria di massa. Il metodo ufficiale pubblicato dalla FDA (Food and Drug Administration) (1) prevede l'analisi mediante GC/MS previa derivatizzazione dell'estratto per rendere volatile la molecola. Questo metodo, messo a punto per matrici quali il latte e i mangimi, permette di raggiungere adeguate sensibilità e può essere esteso ad altre matrici. A tal fine, sono state da noi condotte prove di validazione estendendo l'utilizzo di questa metodica ai prodotti ittici per studiarne l'applicabilità in termini di limite di rivelazione e quantificazione, accuratezza e ripetibilità. Il metodo è stato applicato a prodotti ittici di varia tipologia importati dalla Cina e prelevati dalle Autorità competenti secondo le disposizioni e le modalità previste dal Ministero. In particolare sono stati analizzati campioni di filetti di acciughe, gamberi rossi e diverse tipologie di surimi, preparazione questa a base di proteine di pesce, utilizzata da alcuni secoli in Giappone e che, grazie alle nuove tecniche di produzione e conservazione industriale, si è diffusa in tutto il mondo ed in particolare in Cina. L'attenzione particolare rivolta in questo studio alle diverse varietà di surimi è motivata anche dalla loro attuale diffusione sul desco quotidiano, dovuta sia alla facile reperibilità che alla rapidità di preparazione. In un mercato globalizzato, diventa sempre più importante garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti e pertanto è indispensabile definire una strategia comune volta a potenziare i controlli transfrontalieri al fine di scongiurare il rischio di introduzione nel nostro paese di prodotti vietati ed azzerare la possibilità di rischio per la salute pubblica.

MATERIALI E METODI – Da Novembre 2008 a Giugno 2009 sono stati esaminati 33 campioni di prodotti ittici di importazione di diversa tipologia così come riportato nella figura 1. prelevati secondo il criterio della casualità, dagli Organi Preposti presso i principali porti pugliesi.

Figura 1: Tipologie di campioni esaminati



L'analisi viene effettuata con la seguente procedura: l'intera aliquota di campione viene omogeneizzata e, ad 1 g di omogenato si aggiungono 20 ml della soluzione estraente costituita da dietilammina / acqua / acetonitrile (10 / 40 / 50 v/v/v). Si agita accuratamente e si lascia sonicare per 30 minuti; successivamente si centrifuga per 10 minuti a 5000 rpm. Si filtra il surnatante con filtri acrodisc 0,45 µm, si trasferiscono 200 µl di tale filtrato in una vial ambrata per GC e si porta a secco totale, in bagno maria a 70° C sotto flusso d'azoto; si aggiungono quindi 200 µl di piridina, 200 µl di agente derivatizzante (BSTFA all'1% TMCS) e successivamente 100 µl di standard interno (DACP:

2,6 diammino-4-cloropirimidina) alla concentrazione di 5,0 mg/l in piridina, ossia alla concentrazione di 1,0 mg/l nell'estratto finale. Si vortica e si lascia incubare in stufa a 70 °C per 45 minuti per far avvenire la reazione di silanizzazione. L'analisi degli estratti è stata condotta mediante gas cromatografo Varian 3400 CX, dotato di colonna capillare Varian Factor Four VF-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e corredato di un analizzatore di massa a trappola ionica Saturn 2000-Varian operante in modalità MS/MS alle condizioni riportate in Tab1.

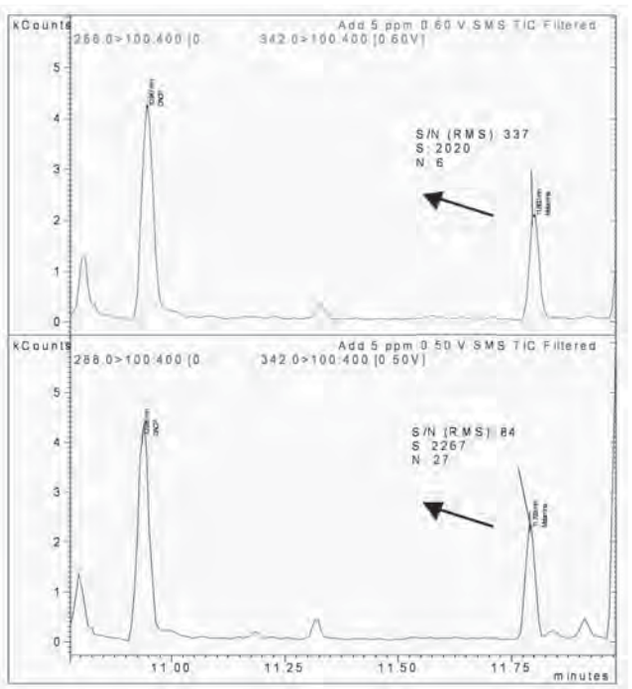
Tabella 1 - Condizioni GC/MS

Temperatura dell'iniettore	250°C
Iniezione 1 µl	modalità splitless
Programmata del Forno	T_1=75°; $Hold_1$=1 min; $Rate_1$=15°C; T_2 = 320°C; $Hold_2$=2,67min.
Carrier gas	Elio (99,999%) - 1 ml/min
Temperatura transfer line	250°C
Temperatura trappola	180°C
Temperatura manifold	100°C
Melamina Parent = 342 m/z	Excitation Amplitude: 0,60 Volts
DACP Parent = 288 m/z	Excitation Amplitude: 0,20 Volts

L'utilizzo dello spettrometro di massa permette di ottenere un'ottima sensibilità ed un'elevata selettività, garantita dalla selezione degli ioni di interesse ossia dello ione precursore a m/z 342 per la melamina e dello ione m/z 288 per il DACP e dal monitoraggio dei frammenti caratteristici, presenti nel range 100-400 m/z, ottenuti all'energie, da noi ottimizzate, di Excitation Amplitude più favorevoli. La quantificazione viene effettuata scegliendo, per ogni analita, lo ione figlio più abbondante ovvero m/z 327 per la melamina e m/z 271 per il DACP. I tempi di ritenzione dei tri-metilsilil derivati sono rispettivamente di 11.75 minuti per la melamina e di 10.90 minuti per il DACP. Sono state costruite rette di taratura, con il metodo dello standard interno, in solvente e in matrice alle concentrazioni di 10 - 25 - 50 -100 µg/l corrispondenti a 0.5, 1.25, 2.5 e 5 mg/l nel campione.
La soluzione madre alla concentrazione di 1000 mg/l dello standard di Melamina viene solubilizzata in una miscela di dietilammina/acqua (20/80) e conservata in vials ambrate alla temperatura di -20°C. Le soluzioni intermedie vengono preparate in piridina e si procede alla derivatizzazione con le stesse modalità previste per i campioni.

RISULTATI E DISCUSSIONE – Diversi sono i metodi di analisi (test ELISA e HPLC/UV/DAD) applicabili alle matrici alimentari per la determinazione della melamina, che presentano però numerosi problemi nella fase di cleanup del campione ed in quella di rivelazione, per la presenza di interferenti e per il mancato raggiungimento delle sensibilità richieste. Il metodo di analisi in GC/MS, pubblicato dalla US FDA, pur richiedendo un preventivo processo di derivatizzazione per rendere volatili gli analiti di interesse, se ottimizzato correttamente permette di raggiungere alte sensibilità e selettività e può essere applicato a numerose matrici oggetto d'indagine. Inizialmente tale metodo è stato messo a punto per la determinazione della melamina nel latte e nei mangimi ma è risultato adeguato anche per i prodotti della pesca e derivati, quali appunto i surimi. La rivelazione mediante analizzatore a trappola ionica è stata ottimizzata al fine di garantire un miglior rapporto segnale/rumore e, quindi, maggiori sensibilità. Un incremento del valore di Excitation Amplitude da 0,50 V a 0,60 V, nell'analisi di un campione di gamberetti fortificato alla concentrazione di 5 mg/kg, ha consentito di ottenere una frammentazione totale dello ione precursore della melamina a m/z 342, con conseguente incremento del segnale dello ione figlio più rappresentativo, così come illustrato in figura 2.

Figura 2: Cromatogrammi e relativi spettri di massa di un campione di gamberetti fortificato con melamina alla concentrazione di 5 mg/kg ed analizzato con 2 diversi valori di excitation amplitude.



È stata effettuata la regressione dei minimi quadrati ordinari e l'analisi statistica dei parametri di regressione della retta media in matrice mediante opportuno software Unichim, oltre che una stima del limite di determinazione strumentale (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) del metodo che risultano rispettivamente pari a 0,58 µg/l e 1,76 µg/l. Per verificare l'adeguatezza del metodo sono state eseguite prove di validazione per la stima della precisione e dell'esattezza utilizzando 6 replicati di un campione di gamberetti a cui sono state addizionate quantità note dello standard certificato di melamina al livello di 2,5 mg/kg corrispondente a 50 µg/kg nell'estratto finale (fattore di diluizione pari a 50). Il metodo mostra, un'ottima ripetibilità con un CV% pari a 10,4%, nonché un valore di recupero pari al 104%. Questi risultati sono in accordo con i valori di riferimento indicati nella normativa europea per la validazione dei metodi analitici (2). Il procedimento analitico ottimizzato, oltre a fornire risultati soddisfacenti in termini di ripetibilità e sensibilità, offre vantaggi di praticità e velocità di esecuzione, nonché un buon contributo nella valutazione di genuinità dei prodotti ittici esaminati per l'assenza della stessa melamina. Infatti, il metodo utilizzato nell'ambito dei controlli previsti dalla Nota Ministeriale N° 21504 del 30/10/08 per i prodotti ittici di importazione, ha consentito di verificare la conformità di tutti i campioni, in cui non sono state rilevate concentrazioni significative di melamina. Questi risultati, pur non destando preoccupazione di carattere sanitario ci inducono a perseverare nei controlli sui prodotti di importazione al fine di prevenire pericolose conseguenze derivanti da tale frode alimentare.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1) GC-MS Method for Screening and Confirmation of Melamine and Related Analogs, US FDA, Version 2 May 7, 2007; 2) Decisione 2002/657/CE. Decisione della Commissione del 12 Agosto 2002.

INDAGINI PRELIMINARI SULLA PRESENZA DI CRONOBACTER (ENTEROBACTER SAKAZAKII) NEL LATTE IN POLVERE

Oliveri G.[1] , Russo Alesi E. M. [1] , Sciortino S. [1] , Guida I.[3] , Valenti R. M. [2], Cardamone C. [1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Area Microbiologia degli Alimenti, Palermo;
[2] Dipartimento di Scienze per la promozione della Salute "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo;
[3] Dottorato in "Alimentazione e Nutrizione Umana", Università degli Studi di Palermo

Key words: *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii),* Powdered infant formula

SUMMARY
Cronobacter (Enterobacter sakazakii) is an emerging foodborne pathogen that causes neonatal meningitis , necrotizing enterocolitis and sepsis with case-fatality rates of 20-50%. Contaminated infant formula has been epidemiologically identified as the source of transmission, although this organism has been isolated from a wide range of foods, food ingredients or food production environments.

INTRODUZIONE
Cronobacter (Enterobacter sakazakii) è un microrganismo patogeno opportunista responsabile nei neonati ed in particolare nei neonati prematuri, con basso peso alla nascita o immunocompromessi, di forme cliniche molto gravi quali enterite necrotizzante, meningite e sepsi con un'evoluzione spesso fatale (1). Numerosi studi hanno dimostrato una forte associazione tra l'insorgenza dell'infezione ed il consumo di latte in polvere (PIF) (Tabella n.1), sebbene *Cronobacter* sia stato isolato da un'ampia varietà di alimenti, di ingredienti per alimenti e negli ambienti dell'industria alimentare (2-3). Il latte in polvere, infatti, diversamente dal latte formulato liquido che viene sottoposto a procedimenti di sterilizzazione, non è sterile, ma contiene una flora microbica saprofita; per questo motivo, l'OMS ha recentemente redatto linee guida per la preparazione, conservazione e manipolazione sicura del latte in polvere , sia in ambito domestico che ospedaliero (5). L'incidenza dell' infezione è bassa, ma nei casi analizzati la letalità è del 20-50 %, mentre sono frequenti nei sopravvissuti complicanze permanenti soprattutto di tipo neurologico. Per questi motivi *Cronobacter* è stato inserito tra i patogeni potenziali di origine alimentare come *Listeria monocytogenes* e *Cryptosporidium parvum*.
Pertanto si rendono necessari studi che abbiano come obiettivo sia di approfondire le conoscenze circa la prevalenza e la patogenicità di questo microrganismo sia di sviluppare adeguate strategie di controllo del rischio .
In questo lavoro gli autori hanno effettuato uno studio su campioni di latte in polvere prelevati nelle province di Palermo e di Trapani alla somministrazione pubblica e presso centri di distribuzione allo scopo di valutarne la flora microbica in termini di presenza di *Enterobacteriaceae,* in particolare di *Cronobacter* e di *Salmonella* spp*..*

MATERIALI E METODI
Le analisi sono state condotte su 40 campioni di latte in polvere:
- 7 campionati nell'ambito del controllo ufficiale previsto dal Decreto Presidente della Repubblica 14-07-1995,
- 14 forniti dall'Unità di Terapia Intensiva Neonatale di un ospedale di Palermo,
- 19 forniti dai reparti di neonatologia e pediatria di tre ospedali della provincia di Trapani.

Tali campioni erano costituiti da :
- 17 formule speciali per lattanti con intolleranza al lattosio,
- 10 formule speciali per lattanti con patologia del tratto gastro-esofageo,
- 8 formule per lattanti sani,
- 2 formule indicate nei casi di diarrea,

Tabella n.1

Localizzazione	Numero di casi (decessi)	Anno	Sorgente di infezione
Casi sporadici			
USA	1 (0)	1981	Sconosciuta
Grecia	2 (0)	1982	Feci
Paesi Bassi	1 (1)	1983	Latte in polvere
Canada	2 (0)	1990	Sconosciuta
Israele	2 (0)	1999-2000	Miscelatore
Belgio	1 (1)	2002	Latte in polvere
Epidemie			
Paesi Bassi	8 (6)	1983	Canale del parto
Grecia	11 (4)	1984	Sconosciuta
USA	4 (0)	1988	Latte in polvere
Islanda	3 (1)	1986-1987	Latte in polvere
Canada	2 (?)	1990	Sconosciuta
Belgio	12 (2)	1998	Latte in polvere
USA	10 (1)	2001	Latte in polvere
Israele	5 (0)	2001	Miscelatore

- 2 formule con idrolisati di sieroproteine del latte vaccino
- 1 formula senza glutine.

Ciascun campione è stato analizzato per la ricerca di *Enterobacteriaceae* (metodo ISO 21528-1), *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii)* (metodo FDA e metodo ISO/TS 22964:2006 E) e *Salmonella* spp.(metodo ISO 6579).Per la ricerca di *Cronobacter* sono stati utilizzati sia il metodo FDA che il metodo ISO/TS 22964:2006(E) al fine di valutarne la sensibilità e la specificità.
La conferma biochimica è stata effettuata oltre che in macrometodo, in micrometodo utilizzando i sistemi miniaturizzati presenti in commercio (API 20 E).

RISULTATI
La ricerca di *Salmonella* spp e di *Cronobacter* ha dato sempre esito negativo, mentre in alcuni campioni è stato possibile isolare ed identificare altri enterobatteri. In particolare: da tre formule per lattanti con intolleranza al lattosio sono stati isolati *Klebsiella planticola*, *Escherichia coli* e *Serratia* spp., mentre tre stipiti di *Enterobacter cloacae* sono stati isolati da due formule per lattanti con patologie del tratto gastroesofageo e da una formula senza glutine. Inoltre uno stipite di *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* è stato isolato dallo stesso campione di latte per lattanti con patologie del tratto gastroesofageo da cui era stato isolato *E. cloacae*. Per quanto riguarda le caratteristiche analitiche delle due metodiche utilizzate per la ricerca di *Cronobacter* , si è messa in evidenza una maggiore selettività dei terreni colturali previsti dalla ISO 21528-1 rispetto a quelli del metodo FDA.

CONCLUSIONI

Nel nostro lavoro sperimentale nessuno dei campioni analizzati è risultato positivo per *Cronobacter* , ma 6 dei 40 campioni analizzati sono risultati contaminati da altri enterobatteri. Lo sviluppo contemporaneo di altre *Enterobacteriaceae* può impedire o mascherare la crescita di *Cronobacter* con la conseguente possibilità di falsi negativi.

I risultati ottenuti, seppur scaturiti da analisi condotte su un numero non elevato di campioni, confermano i dati presenti in letteratura sulla presenza di basse concentrazioni di *Enterobacteriaceae* nel latte in polvere. Il rischio di infezione da *Cronobacter* connesso con il consumo di latte formulato in polvere sembra quindi caratterizzato, più che dalla carica del microrganismo, dalla sua elevata patogenicità in una popolazione particolarmente sensibile. E' interessante a questo proposito sottolineare che *Cronobacter* comincia ad essere documentato come agente di infezioni gravi anche in soggetti adulti immunocompromessi ed anziani (4).

In questo contesto è estremamente importante attuare le opportune strategie preventive per una corretta gestione del rischio. Tali azioni preventive riguardano diversi ambiti: la fase di produzione, la fase di preparazione precedente il consumo, l'informazione agli utilizzatori.

Per quanto riguarda la produzione è necessario monitorare le materie prime, gli ingredienti e le fasi successive al trattamento termico nelle quali il prodotto è esposto a ricontaminazione batterica, incrementare la frequenza dei controlli negli ambienti di produzione e sul prodotto finito, ridurre i livelli delle *Enterobacteriaceae* negli ambienti di produzione. La fase di ricostituzione della formula è sicuramente un punto critico importante considerato che l'ambiente domestico, ospedaliero e gli asili nido espongono il prodotto a potenziali contaminazioni ed a proliferazione della flora saprofitica presente. A tale proposito è necessaria formazione specifica degli operatori dei reparti di neonatologia, degli asili nido e in generale degli utilizzatori.

I dati bibliografici finora disponibili necessitano di ulteriori approfondimenti al fine di definire gli elementi caratterizzanti il rischio utili alla definizione di precise misure di prevenzione. In riferimento alla situazione in Italia dove ad oggi non si segnalano casi clinici, è necessario effettuare indagini a largo spettro che analizzino il grado di esposizione al rischio ed il livello di contaminazione degli alimenti, degli ambienti ospedalieri, domestici e delle industrie alimentari.

BIBLIOGRAFIA

1. Bar-Oz B., Preminger A.,Peleg O., Block C., Arad I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Pediatr* 2001; 90:356-58
2. CAC (Codex Alimentarius Commission) Risk profile of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula. Roma:Joint Office FAO/WHO 2003
3. Iversen C., Forsysthe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Sci and Technol* 2003, 14:443-54
4. See KC, Than HA, Tang T. Enterobacter sakazakii bacteremia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. *Age Ageing* 2007, 36: 595-596
5. WHO/OMS. Guidelines for the safe preparation, storage and handling of powdered infant formula. 2007.

Ringraziamenti : Di Salvo F., Genovese A. , Lombardo M . , Rizzuto M. L.

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI SCREENING PER LA RICERCA DI LEVAMISOLO IN LATTE BOVINO MEDIANTE LC-MS

Olivo F.[1], Gili M.[1], Stella P.[1], Benetti C.[2]
[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie, Legnaro (Pd)

Key words: latte, levamisolo, validazione

ABSTRACT
Every year the number of matrix and residue to monitor in the National Residue Monitoring Plan is increased to improve the consumer and health security. One of the change in the last edition was the introduction of levamisole in milk. A rapid and very effective HPLC-MS procedure for the detection of levamisole in milk was developed and tested. The method validation study was performed according to criteria defined by Decision 2002/657/EC for qualitative screening methods, and the following parameters were determined: linearity, specificity, CCβ, ruggedness and stability. The proposed method is suitable for screening analysis.

INTRODUZIONE
Il levamisolo è un farmaco appartenente alla classe degli imidazotiazoli dotato di azione antielmintica ad ampio spettro. E' utilizzato negli allevamenti di suini, ovini, pollame ma soprattutto per i bovini, per la sua azione nematocida nei confronti delle principali forme di parassiti presenti nell'abomaso, nel piccolo intestino e nel grande intestino dei ruminanti.
In Italia il levamisolo è commercializzato per lo più in forma farmaceutica ad uso parenterale, con un tempo di sospensione per le carni variabile da un minimo di 7 ad un massimo di 18 giorni a seconda della specie.
Le concentrazioni residuali maggiori si evidenziano a livello epatico, anche se quantità misurabili di farmaco sono presenti anche in muscoli, grasso e rene.
La Direttiva del Consiglio 96/23/CE inserisce il levamisolo nella classe B2 [2].
Il latte può presentare un importante elemento di rischio per la salute del consumatore, visto il suo consumo esteso e la capacità del farmaco di accumularsi in tale matrice, maggiore nel caso di somministrazione orale rispetto a quella parenterale. Tuttavia, al momento, non è stato ancora definito dall'E.M.E.A.[1] un valore di MRL nel latte, per cui il suo impiego non è autorizzato per animali che producono latte destinato al consumo umano.
La necessità di effettuare controlli relativi alla presenza di lavamisolo nel latte è una problematica già considerata da tempo in alcuni Paesi esterni alla Unione Europea, tra cui l' Australia.
Dal 2009 la Commissione Europea ha richiesto agli Stati Membri di inserire nel Piano Nazionale Residui (PNR) la ricerca del levamisolo nel latte bovino, pur non indicando il livello minimo di screening.
Nel presente lavoro si descrive lo sviluppo di un metodo di screening per la ricerca di levamisolo nel latte e la sua validazione in accordo ai requisiti comunitari richiesti dalla Decisione 2002/657/CE [3].
Secondo tale normativa comunitaria, per una prova di screening di tipo qualitativo devono essere obbligatoriamente valutate tre caratteristiche: specificità, capacità di rivelazione (CCβ) e robustezza. Per completare il processo di validazione sono state inoltre valutate, anche se non espressamente richiesto dalla Decisione 2002/657/CE, la linearità della risposta strumentale, la stabilità degli standard e degli estratti, la ripetibilità e il recupero se pur ad un solo livello.

MATERIALI E METODI
PREPARAZIONE CAMPIONI – A 3 g di latte fortificato con standard interno (mebendazolo) a livello di 50 µg/Kg, sono aggiunti 600 µL di idrossido di potassio 50% m/v, 12 mL di acetato di etile e 4.5 g di solfato di sodio anidro. Dopo estrazione in agitatore rotante per 10 min. e centrifugazione (4000 rpm, 10 min.), 3 mL di surnatante sono trasferiti in provetta, addizionati con 3 ml di n-esano, agitati in agitatore rotante per 5 min e centrifugati (4000 rpm, 5 min.).
Una aliquota (3 ml) di surnatante è sottoposta a purificazione su colonne SPE Cyano (500 mg/3mL). L'estratto purificato è evaporato a 50°C in corrente di azoto; il residuo, è ripreso con 1 ml di miscela acetonitrile/tampone ammonio acetato 50 mM pH 4.5 (50/50 V/V), e sottoposto ad analisi HPLC-MS.

CONDIZIONI ANALITICHE – Lo strumento utilizzato è un cromatografo HPLC Accela™, interfacciato con uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo Thermo TSQ Vantage (Thermo Electron, San Jose, CA, USA), operante in modalità ESI positiva. La colonna analitica impiegata per la separazione è una Phenomenex Synergy Polar® C18 (150 x 2.1 mm i.d., 4 µm), munita di precolonna Phenomenex C18 (4 x 3 mm, 3.5 µm), termostatata a 40°C. La separazione prevede una eluizione a gradiente con fase mobile tampone ammonio acetato 10 mM pH 4.5 (B) e acetonitrile (A), flusso di 200 µL/min e volume di iniezione di 10 µL. L'acquisizione è stata effettuata in modalità SRM, considerando le transizioni 205.2→178.3 e 205.2→91.4 per il levamisolo e 296.1→ 264.2 per il mebendazolo.

STUDIO DI VALIDAZIONE – Uno tra i primi aspetti considerati è stato la scelta del livello di interesse. Non avendo alcun riferimento a livello nazionale e comunitario, è stato scelto un livello di 10 µg/Kg, che rapprsenta il limite minimo di prestazione analitica nel latte fissato per i benzoimidazoli, classe di sostanze simili agli imidazotiazoli a cui appartiene il levamisolo.
Il processo di validazione del metodo è stato condotto seguendo lo schema proposto nella "Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova immunochimici di screening in accordo con la decisione 2002/657/EC"[4] e nella "Linea Guida per la validazione intralaboratorio di metodi di prova di conferma per le sostanze di Cat. B"[5] della Rete II.ZZ.SS., valutando i seguenti indici di prestazione:

- Linearità della risposta – Valutata mediante la costruzione di una curva di taratura con i dati ottenuti iniettando cinque soluzioni standard in solvente, a livelli di concentrazione nell'intervallo 1÷20 pg/µL replicate tre volte. L'algoritmo utilizzato è stato quello dei minimi quadrati non pesati; della retta ottenuta si è verificato il coefficiente di determinazione, la distribuzione dei fattori di risposta y_i/x_i, la significatività dell'intercetta e il limite di rilevabilità.
  I due livelli estremi della curva sono stati inseriti in ogni sequenza analitica al fine di poter quantificare il contenuto di levamisolo nel campione analizzato, per ottenere una stima del recupero e della precisione.
- Specificità – Valutata su 20 campioni di latte, verificando nei singoli cromatogrammi che, nell'intervallo $\Delta t = t_R$ standard ± 2,5%, non siano presenti interferenti della

matrice.

- Capacità di rilevazione CCβ – Determinato su 20 matrici negative fortificate a 10 µg/Kg. Il CCβ, introdotto dalla Dec. 2002/657/EC, ha un significato importante nei metodi di screening in quanto valuta le prestazioni del metodo, consentendo di verificare che la probabilità di risultati "falsi-negativi" sia inferiore al 5%, requisito principale atteso da un metodo di screening; esiti "falsi-positivi" allo screening risultano meno critici poiché saranno sempre seguiti da una prova di conferma. Le prove per la verifica del rispetto dell'errore β (≤ 5%) e della specificità sono state condotte parallelamente: a ciascun bianco-campione è stato associato il suo fortificato nella stessa seduta analitica. La presenza dell'analita è stata verificata in tutti i 20 fortificati sulla base del tempo di ritenzione (=± 2,5% t_R standard) e dello spettro di massa. L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando l'area del segnale cromatografico.
- Robustezza – Valutata mediante 8 prove su un campione fortificato a 10 µg/Kg, attraverso l'introduzione di piccole variazioni (non superiori al 10% del valore nominale) nelle fasi di preparazione del campione e di esecuzione dell'analisi, secondo il modello di Youden[6]. Le 7 variabili scelte sono state:
  1. volume solvente di estrazione,
  2. concentrazione soluzione idrossido di potassio,
  3. quantità di solfato di sodio anidro
  4. volume di lavaggio colonne SPE,
  5. volume di eluizione colonne SPE
  6. temperatura evaporazione estratto
  7. pH solvente di ripresa estratto finale

- Stabilità delle soluzioni standard – Verificata analizzando periodicamente soluzioni preparate al momento dell'uso dalla soluzione madre conservata a 4°C al riparo dalla luce, per rilevare la percentuale di decremento del titolo. E' stata verificata anche la stabilità delle soluzioni di drogaggio dell'analita e dello standard interno.
- Stabilità degli estratti – Verificata analizzando dopo una settimana estratti di campioni fortificati a 10 µg/Kg e conservati a 4°C, evidenziando eventuali problemi di rilevazione e identificazione.
- Ripetibilità e recupero – Valutata considerando l'RSD% dei valori ottenuti dalle prove di verifica dell' errore β e il rapporto

  $R\% = C_{osservato}$ (µg/Kg) / $C_{teorico}$(µg/Kg) *100.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo strumento utilizzato è dotato, all'interfaccia Ion Max e in particolare al probe H-ESI II, di un sistema di pre-riscaldamento (50-450°C) del gas di vaporizzazione (auxiliary gas), che consente una maggiore efficienza della formazione dello spray, una maggiore sensibilità e la capacità di raggiungere limiti strumentali molto bassi, mantenendo valori di S/N buoni. Nel caso specifico del levamisolo, si è verificato che per l'analita in solvente la risposta strumentale aumenta con l'aumentare della temperatura fino a 280°C. Dal confronto tra le risposte di campioni positivizzati-post e quelle di uno standard in solvente a pari concentrazione, è stata ottenuta una stima dell'effetto matrice, che è risultato maggiore all'aumentare della temperatura. Data l'intenzione di effettuare anche una stima quantitativa e non disponendo di uno standard deuterato si è quindi scelto di lavorare a una temperatura di vaporizzazione di 50°C.

L'utilizzo di un sistema LC-MS a triplo quadrupolo e la ottimizzazione delle condizioni strumentali effettuata durante lo sviluppo del metodo consentono una soddisfacente e ripetibile rivelazione e identificazione dell'analita.

Il metodo di analisi descritto consente, attraverso una procedura relativamente semplice, di ottenere un efficace grado di purificazione del campione: i cromatogrammi delle prove di specificità risultano privi di segnali dovuti a sostanze co-estratte. Pur trattandosi di un metodo qualitativo, è stata valutata la linearità della risposta strumentale, poiché nelle analisi di routine si effettua comunque una verifica dello stato di taratura dell'LC-MS. La risposta è risultata lineare nel range di concentrazione 1÷20 pg/µL, con R^2 = 0.999, fattori di risposta ai vari livelli compresi nell'intervallo y/x_{medio} ± 10%, intercetta non significativamente diversa da 0, limite di rilevabilità = 0.35 pg/µl; inoltre, già al punto più basso della curva, il rapporto segnale rumore è elevato (S/N > 400).

Il parametro più critico da verificare nei metodi di screening è la capacità di rilevazione (CCβ), definita come la più piccola quantità di sostanza che è possibile rilevare, identificare e quantificare con una probabilità di errore β ≤ 5%.

Dei tre possibili approcci indicati nella Decisione 2002/657/CE, è stato adottato quello che prevede di analizzare almeno 20 campioni bianchi fortificati al limite di prestazione analitica. Questo approccio, adatto per i metodi qualitativi, non consente di definire un valore esatto di CCβ, ma permette di verificare che il limite per l'errore β (<5%) al livello di interesse sia rispettato. La risposta media per i campioni fortificati, espressa come area del segnale, presenta una certa omogeneità anche tra sedute diverse con un RSD% di 11 sia per il levamisolo che per lo standard interno (mebendazolo). Tutti i fortificati sono da considerarsi positivi, per cui l'errore β risulta < 5% in accordo ai requisiti comunitari e il CCβ < 10 µg/kg. Anche l'identificazione risulta verificata al livello studiato, così da ridurre la % di falsi positivi.

Con i dati delle prove per la verifica del CCβ è stata impostata una carta di controllo tipo Shewart sui valori di area di standard interno, da utilizzare per il controllo della seduta; inoltre, esprimendo la risposta in concentrazione anziché in segnale, è stato possibile effettuare una stima del recupero del metodo, risultato pari all' 84%.

Lo studio di robustezza non ha evidenziato la presenza di variabili critiche tra quelle considerate e in relazione ai cambiamenti apportati, per cui il metodo può esser considerato robusto.

Gli estratti dei campioni sono risultati stabili per almeno una settimana conservati a 4°C. Le soluzioni madri e di drogaggio sono risultate stabili per un periodo non inferiore a 6 mesi, conservate a 4°C.

CONCLUSIONI

Il metodo messo a punto presenta caratteristiche di specificità, precisione e robustezza adeguate allo scopo, per cui risulta idoneo alle analisi di screening effettuate nell'ambito dei controlli ufficiali.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Direttiva del Consiglio del 29 aprile 1996 (96/23/EC), G.U.C.E. L.125, 1996.
2. EMEA European Medicines Agency LEVAMISOLE SUMMARY REPORT
3. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 (2002/657/CE), G.U.C.E. L.221, 2002.
4. Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova immunochimici di screening in accordo con la decisione 2002/657/EC rev. 1.
5. Linea Guida per la validazione intralaboratorio di metodi di prova di conferma per le sostanze di Cat. B rev 0.
6. W.J.Youden, E.H.Steiner, Statistical Manual of AOAC, Association of Official Analytical Chemist, 33, 1975.

VALIDAZIONE DI UN METODO DI SCREENING PER LA RICERCA DI AGENTI ANTITIROIDEI IN URINA MEDIANTE LC-MS

Olivo F., Gili M., Savio V., Migarone E., Abete M.C.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Key words: urina, tireostatici, validazione

ABSTRACT
Thyreostatic compounds are active drugs which may be used to increase the weight of cattle prior to slaughter. This weight gain is mainly due to increased water absorption and retention within edible tissue as well as filling of the gastro-intestinal tract. The consequence of such abuse is not only the production of inferior meat quality, but overall the potential risk to human health of drug residues.
For these reasons, thyreostats are banned within the EU since 1981 (Directive 81/602/EC)[1] for animal production.
A rapid analytical procedure for the detection of four thyreostats in bovine urine was validated according to criteria defined by Decision 2002/657/EC[2] for qualitative screening methods.

INTRODUZIONE
Il modificarsi della richiesta di carni verso contenuti più bassi di grassi e colesterolo ha indirizzato nel corso degli anni l'utilizzo da parte degli allevatori di una serie di composti, genericamente indicati come "promotori di crescita", eterogenei per struttura chimica e meccanismo d'azione, ma dotati di alcune caratteristiche comuni, quali la capacità di aumentare l'accrescimento corporeo degli animali, favorire la deposizione di proteine e limitare l'accumulo di lipidi nella carcassa.
Tra queste, fin dagli anni Sessanta sono stati utilizzati i tireostatici, farmaci che inibiscono il funzionamento della tiroide con conseguente diminuzione della sintesi degli ormoni tiroidei Tiroxina (T4) e Triiodiotironina (T3).
Nella pratica zootecnica i tireostatici, somministrati con l'alimento nelle ultime 4-8 settimane prima della macellazione e rapidamente assorbiti, alterano il metabolismo energetico, prevenendo la sintesi degli ormoni tiroidei. L'effetto metabolico sfruttato è l'aumento della ritenzione idrica dei tessuti (caso delle carni "gonfiate"), con coprostasi e urinostasi. Si ottiene pertanto una carne che pesa di più, ma non ha maggiore valore nutritivo.
Poiché tali sostanze si sono rivelate pericolose per la salute del consumatore, il loro utilizzo è stato vietato all'interno della UE fin dal 1981 (Direttiva 81/602/EC)[1]. Tale divieto è stato ribadito successivamente nella Dir. 96/22/CE, emendata dalla Dir. 2003/74/CE[3]. Nonostante il loro impiego sia risultato in decremento perché facilmente rilevabile dopo la macellazione dell'animale, a causa dell'indotta ipertrofia della tiroide, il livello di attenzione è mantenuto comunque alto.
La Direttiva 96/23/CE[4] inserisce i tireostatici in categoria A2.
Poiché al presente per questi farmaci non è ancora stato fissato a livello comunitario un valore di MRPL, sono stabiliti dei limiti di prestazione analitica a livello nazionale, pari a 100 µg/kg. Il Piano Nazionale Residui (PNR) prevede la ricerca di tireostatici in tiroide, muscolo e, per i bovini, nell'urina.
Dovendo il laboratorio mettere a punto un metodo di screening sull'urina, dapprima si è cercato di estendere a tale matrice il metodo HPLC-DAD già in uso per le stesse molecole in tiroide e muscolo, ma con esito negativo, a causa dei problemi di interferenza di matrice. Sulla base di una ricerca bibliografica si è quindi scelto di adottare il metodo sviluppato dal RIVM di Bilthoven[5], apportando alcune semplificazioni per esigenze di laboratorio.
Nel presente lavoro si descrive la validazione di un metodo di screening LC-MS per la ricerca degli antitiroidei di interesse veterinario (tiouracile, metil-tiouracile, propil-tiouracile e fenil-tiouracile) in urina, in accordo ai requisiti comunitari richiesti dalla Decisione 2002/657/CE [2].
Le caratteristiche verificate durante la validazione sono state: specificità, capacità di rivelazione (CCβ) e robustezza. Per completare il processo di validazione sono state inoltre valutate, anche se non espressamente richiesto dalla Decisione 2002/657/CE, la linearità della risposta strumentale e la stabilità degli standard e degli estratti.

MATERIALI E METODI
PREPARAZIONE CAMPIONI – A 1 ml di urina centrifugata e fortificata con standard interno (dimetil-tiouracile) a livello di 50 µg/Kg sono addizionati 0.5 g di cloruro di sodio; l'estrazione è effettuata in agitatore ad inversione per due volte con 4 e poi con 8 ml di miscela acetonitrile/dicolorometano (75/25 V/V); dopo centrifugazione (4000 rpm, 5 min.), i surnatanti riuniti in provetta sono evaporati a 45 °C in corrente di azoto. Il residuo è ripreso con 5 ml di tampone fosfato 2M a pH 8.0, e addizionato con 100 µL di soluzione di derivatizzazione (7-cloro-4-nitrofurazano a 2.5 mg/mL in metanolo). Dopo agitazione in agitatore a vibrazione per 30 secondi e incubazione di 1 h a 40°C, gli analiti sono estratti con 3 x 5 ml di acetato di etile, mediante agitazione in agitatore a vibrazione e poi in agitatore ad inversione per 15 min. e centrifugazione. Dopo evaporazione degli estratti organici a 45°C in corrente di azoto, il residuo è ripreso con 1 ml di miscela acido acetico acquoso 0.1%/acetonitrile (40/60 V/V), e sottoposto ad analisi HPLC-MS.

CONDIZIONI ANALITICHE – Lo strumento utilizzato è un cromatografo HPLC Surveyor™, interfacciato con uno spettrometro di massa con analizzatore a trappola lineare Thermo LTQ (Thermo Electron, San Jose, CA, USA), operante in modalità ESI positiva. La colonna analitica impiegata per la separazione è una Phenomenex Synergy Polar® C18 (150 x 2.1 mm i.d., 4 µm), munita di precolonna Phenomenex C18 (4 x 3 mm, 3.5 µm), termostatata a 40°C. La separazione prevede una eluizione a gradiente con fase mobile acido acetico 0.1% (B) e acetonitrile (A), flusso di 200 µL/min e volume di iniezione di 10 µL. L'acquisizione è stata effettuata in modalità Full MS^2 e il segnale è stato ottenuto in ioni estratti (EIC), considerando le transizioni riportate in tabella 1.

STUDIO DI VALIDAZIONE – Il livello di interesse a cui fortificare i campioni è stato scelto a 50 µg/Kg, pari a 0.5 volte il livello minimo di screening richiesto dal PNR, in modo da garantire una maggiore capacità di rilevazione di eventuali trattamenti illeciti. Lo stesso livello è stato considerato per lo standard interno di processo (dimetiltiouracile).
Il processo di validazione del metodo è stato condotto seguendo lo schema proposto nella "Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova immunochimici di screening in accordo con la decisione 2002/657/EC"[6] e valutando i seguenti indici di prestazione:

- Linearità della risposta – Valutata mediante la costruzione di una curva di taratura dai dati ottenuti iniettando quattro soluzioni standard in solvente, a livelli di concentrazione nell'intervallo 5÷40 pg/µL replicate tre volte. L'algoritmo utilizzato è stato quello dei minimi quadrati non pesati; della retta ottenuta si è verificato il coefficiente di determinazione, la distribuzione dei fattori di risposta y_i/x_i, la significatività dell'intercetta e il limite di rilevabilità.

- Specificità – Valutata su 20 campioni di urina, verificando nei singoli cromatogrammi che, nell'intervallo $\Delta t = t_R$ standard ± 2,5%, non siano presenti interferenti della matrice.
- Capacità di rilevazione CCβ – Determinato su 20 matrici negative fortificate a 50 µg/Kg. Il CCβ, introdotto dalla Dec. 2002/657/EC, ha un significato importante nei metodi di screening in quanto valuta le prestazioni del metodo, consentendo di verificare che la probabilità di risultati "falsi-negativi" sia inferiore al 5%, requisito principale atteso da un metodo di screening; esiti "falsi-positivi" allo screening risultano meno critici poiché saranno sempre seguiti da una prova di conferma. Le prove per la verifica della specificità e del rispetto dell'errore β (≤ 5%) sono state condotte parallelamente: a ciascun bianco-campione è stato associato il suo fortificato nella stessa seduta analitica. La presenza degli analiti è stata verificata in tutti i 20 fortificati sulla base del tempo di ritenzione (=± 2,5% t_R standard) e dello spettro di massa. La risposta strumentale è stata espressa come area del segnale cromatografico.
- Robustezza – Valutata mediante 8 prove su un campione fortificato a 50 µg/Kg, attraverso l'introduzione di piccole variazioni (non superiori al 10% del valore nominale) nelle fasi di preparazione del campione e di esecuzione dell'analisi, secondo il modello di Youden[7]. Le 7 variabili scelte sono state:
  1. quantità di cloruro di sodio,
  2. composizione miscela di estrazione,
  3. tempo di prima estrazione
  4. pH tampone fosfato 2M,
  5. temperatura prima evaporazione
  6. temperatura seconda evaporazione
  7. composizione solvente di ripresa estratto finale
- Stabilità delle soluzioni standard – Verificata analizzando periodicamente soluzioni preparate al momento dell'uso, con opportuna diluizione e derivatizzazione, dalle soluzioni madri conservate a -20°C al riparo dalla luce, per rilevare la percentuale di decremento del titolo.
- Stabilità degli estratti – la stabilità degli estratti è già documentata in bibliografia, per cui è stata verificata solo la stabilità di estratti di campioni fortificati conservati a temperatura ambiente per due giorni, evidenziando eventuali problemi di rilevazione legati alla loro permanenza in autocampionatore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli indici di prestazione ottenuti in fase di validazione e i relativi valori sono riportati nella tabella 2.

Il metodo di analisi descritto consente, attraverso una procedura relativamente semplice, di ottenere un efficace grado di purificazione del campione: i cromatogrammi delle prove di specificità risultano privi di segnali dovuti a sostanze co-estratte. Pur trattandosi di un metodo qualitativo, è stata valutata la linearità della risposta strumentale, poiché nelle analisi di routine si effettua comunque una verifica dello stato di taratura dell'LC-MS.

Il parametro più critico da verificare nei metodi di screening è la capacità di rilevazione (CCβ) definita come la più piccola quantità di sostanza che è possibile rilevare, identificare e quantificare con una probabilità di errore β ≤ 5%.

Dei tre possibili approcci indicati nella Decisione 2002/657/CE, è stato adottato quello che prevede di analizzare almeno 20 campioni bianchi fortificati al limite di prestazione analitica. Questo approccio, adatto per i metodi qualitativi, non consente di definire un valore esatto di CCβ, ma permette di verificare che il limite per l'errore β (<5%) al livello di interesse, sia rispettato. Tutti i fortificati sono da considerarsi positivi per cui l'errore β risulta inferiore al 5% in accordo ai requisiti comunitari. Anche l'identificazione risulta verificata al livello studiato in modo da ridurre la % di falsi positivi.

Dai dati delle prove per la verifica del CCβ si è impostato una carta di controllo tipo Shewart sui valori di area di standard interno, da utilizzare in screening per il controllo della seduta.

Lo studio di robustezza non ha evidenziato la presenza di variabili critiche tra quelle considerate e in relazione ai cambiamenti apportati.

Gli estratti dei campioni sono risultati stabili per due giorni a temperatura ambiente. Le soluzioni madri sono risultate stabili per un periodo non inferiore a 1 anno, conservate a -20°C, mentre quelle di drogaggio sono stabili a -20°C per 1 mese.

CONCLUSIONI

Il metodo messo a punto presenta caratteristiche di specificità, precisione e robustezza adeguate allo scopo, per cui risulta idoneo alle analisi di screening effettuate nell'ambito dei controlli ufficiali.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Direttiva del Consiglio del 31 luglio 1981 (81/602/EC), G.U.C.E. L.222/32, 1981.
2. Direttiva del Consiglio del 22 settembre 2003 (2003/74/CE), G.U.C.E. L.262, 2003.
3. Direttiva del Consiglio del 29 aprile 1996 (96/23/EC), G.U.C.E. L.125, 1996.
4. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 (2002/657/CE), G.U.C.E. L.221, 2002.
5. SOP : ARO /440 TITLE: Analysis of thyreostatics in bovine urine by LC-MS DATE: 13/01/2005 RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu) di Bilthoven (Olanda)
6. Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova immunochimici di screening in accordo con la decisione 2002/657/EC rev. 1.
7. W.J.Youden, E.H.Steiner, Statistical Manual of AOAC, Association of Official Analytical Chemist, 33, 1975.

Tabella 1: Transizioni considerate	
Tiouracile	**292.3→229.3** **292.3→246.3**
Metil-tiouracile	**306.2→243.3** **306.2→260.3**
Dimetil-tiouracile	**320.3→257.3**
Propil-tiouracile	**334.3→271.3** **334.3→288.3**
Fenil-tiouracile	**368.3→305.3** **368.3→322.3**

Tabella 2: Risultati di validazione	
Linearità	Verificata nel range 5÷40 pg/µL R^2 = 0.999 y_i/x_i, nell'intervallo y/x_{medio} ± 10%
Specificità	verificata su 20 campioni
CCβ	≤ 50 µg/Kg
Errore β	< 5%
Robustezza	Metodo robusto
Stabilità soluzione madre	1 anno a -20°C al buio
Stabilità soluzione di lavoro	1 mese a -20 al buio
Stabilità estratto	Almeno due giorni a temperatura ambiente

CARATTERIZZAZIONE SIEROLOGICA E GENOTIPICA DI CEPPI DI *Listeria monocytogenes* ISOLATI DA CIAUSCOLO

[1]Palombo B., [2]Gattuso A., [1]Lanciotti M., [2]Cucci S., [2]Gianfranceschi M.V., [1]Blasi G.
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Fermo; [2]Istituto Superiore di Sanità - Roma

Key words: *Listeria monocytogenes,* PCR, PFGE.

ABSTRACT
Listeria monocytogenes is a food borne pathogen associated with severe diseases in humans and animals. The aim of this study was to characterize, by molecular methods (multiplex-PCR serotyping and PFGE), *26 Listeria monocytogenes* strains, isolated from "ciauscolo", a typical raw fermented meat product of Marche Region in order to establish epidemiological links between strains. Four different *L. monocytogenes* serotypes were found: 1/2a (53.8%), 1/2c (34.6%), 4b (7.7%) and 1/2b (3.8%). The isolates were divided into 18 distinct AscI pulsotypes grouped into 5 pulsogroups.

INTRODUZIONE
Listeria monocytogenes (*L.m.*) è un microrganismo patogeno responsabile di severe infezioni sistemiche nell'uomo ed in diverse specie animali. Tale germe è ampiamente diffuso nell'ambiente e viene trasmesso, nella maggior parte dei casi, attraverso l'ingestione di alimenti contaminati. Negli ultimi tempi si è rivolta particolare attenzione al controllo della contaminazione da *L.m.* nei prodotti carnei, in conseguenza anche di alcuni episodi epidemici legati al consumo di salumi contaminati come quello verificatosi nel 1998 negli Stati Uniti (110 casi) (European Commission, 1999).
Obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare, mediante multiplex PCR ed elettroforesi in campo pulsato (PFGE), ceppi di *L.m.* isolati nelle diverse fasi del processo produttivo di un insaccato di carne suina tipico dell'entroterra marchigiano, il Ciauscolo, al fine di stimare la prevalenza dei sierotipi, evidenziare la persistenza o meno della colonizzazione all'interno di un singolo stabilimento ed individuare eventuali correlazioni tra ceppi isolati in stabilimenti diversi.

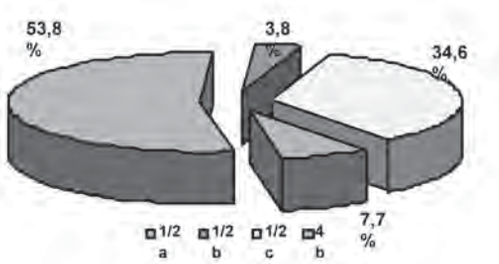
MATERIALI E METODI
Ceppi batterici: l'indagine è stata condotta su 26 ceppi di *L.m.* isolati, nel periodo ottobre 2006 – gennaio 2008, da semilavorati e prodotti finiti oggetto di uno studio di caratterizzazione del ciauscolo (1). In ciascuno dei quattro produttori coinvolti, si è proceduto al campionamento di tre differenti lotti di produzione effettuando prelievi dell'impasto e del prodotto a 24, 48 ore e a 5, 10, 20, 30 e 40 gg. dall'inizio della produzione. Per lo stabilimento 2, inoltre, sono stati analizzati ulteriori 7 campioni del secondo lotto al fine di verificare l'influenza di una modifica apportata al processo produttivo: l'utilizzo per l'insaccamento del budello di una specie diversa da quella normalmente impiegata. La ricerca di *L.m.* è stata effettuata con metodica interna, validata ed accreditata SINAL (secondo norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025) che prevede quattro fasi operative: due arricchimenti in terreno liquido selettivo, Half Fraser Broth e Fraser Broth; isolamento su terreno solido selettivo, Oxford e Aloa; identificazione biochimica e morfologia delle colonie sospette (Gram, catalasi, emolisi ed API Listeria - BioMerieux). Gli isolati, identificati con codice numerico, sono stati conservati in CryoBank.

Sierotipizzazione mediante PCR multiplex: è stata eseguita utilizzando i primers descritti nel lavoro pubblicato da Doumith et al. (2) che permettono di separare i 4 maggiori sierotipi di *L.m.* (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) in 4 gruppi distinti. La conferma dei sierotipi all'interno dei singoli sierogruppi è stata effettuata utilizzando la metodica della siero-agglutinazione.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): l'estrazione del DNA, la digestione dei campioni con l'enzima *AscI* e l'elettroforesi in campo pulsato sono state eseguite secondo il protocollo descritto da Graves and Swaminathan (3) per il programma PulseNet. Come riferimento per l'analisi dei profili di restrizione viene caricato su ogni gel il DNA genomico di *Salmonella* ser. Braenderup strain H9812, digerito con enzima *XbaI*. La corsa elettroforetica è stata eseguita utilizzando un sistema CHEF-DR III (Bio-Rad) ad un gradiente di 6 V/cm, angolo 120°, uno switch time di 4 - 40 secondi a 14 °C per 21 ore. Il gel è stato colorato con etidio bromuro e l'immagine acquisita con il sistema di acquisizione immagini Bio-Rad Gel Doc 2000™ (Bio-Rad). I profili molecolari sono stati analizzati con il software BioNumerics (ver. 4.0; Applied Maths) che elabora il dendrogramma mediante l'Underweight-Pair Group Matching Algorithm (UPGMA) a partire da una matrice di similarità ottenuta utilizzando il coefficiente di correlazione Dice con limite di tolleranza e ottimizzazione dell'1,0%.

RISULTATI
L'esecuzione della multiplex PCR e della siero-agglutinazione ha permesso di identificare il 53,8% dei ceppi di *L.m.* come appartenente al sierotipo 1/2a, il 34,6% al sierotipo 1/2c, il 7,7% al sierotipo 4b e il 3,8% al sierotipo 1/2b (Figura 1).

Figura 1. *Distribuzione percentuale dei sierotipi di L. monocytogenes*



I ceppi tipizzati con PFGE hanno evidenziato profili di restrizione caratterizzati da un numero di bande compreso tra 6 e 11. Sono stati considerati uguali solo i ceppi con profilo di restrizione indistinguibile sia per il numero che per la posizione delle bande.
I 26 ceppi di *L.m.* sono stati suddivisi in 18 pulsotipi e raggruppati in 5 pulsogruppi con un livello di similarità ≥ 80%. I pulsogruppi sono stati contraddistinti con le lettere dalla A alla E in ordine decrescente di numerosità di ceppi.

Tabella 1. *Rappresentazione dei pulsogruppi in ordine crescente di numerosità di isolati.*

Pulsogruppi	N°. Pulsotipi (N°. di Isolati)	Sierotipo (N°. di isolati)
A	5 (8)	1/2a (8)
B	3 (8)	1/2c (8)
C	3 (3)	1/2a (3)
D	2 (2)	4b (2)
E	2 (2)	1/2a (2)
Isolati senza pulsogruppo	3 (3)	1/2a (1), 1/2b (1), 1/2c (1)
Totale	18(26)	1/2a (14), 1/2b (1), 1/2c (9), 4b (2)

Il pulsogruppo A comprende 8 isolati suddivisi in 5 pulsotipi con un livello minimo di similarità dell'84,0%. Tutti i ceppi sono di sierotipo 1/2a. Il pulsogruppo B è costituito da 8 ceppi suddivisi in 3 pulsotipi con un livello minimo di similarità dell' 80,7%. Tutti i ceppi sono di sierotipo 1/2c. Il pulsogruppo C è costituito da 3 isolati suddivisi in 3 pulsotipi con livello minimo di similarità del 91,5%. Tutti i ceppi sono di sierotipo 1/2a. I pulsogruppi D ed E sono costituiti entrambi da 2 isolati, di sierotipo 4b ed 1/2a (tabella 1). I profili di restrizione di tutti i ceppi hanno una percentuale di omologia che varia da un minimo del 33,8% ad un massimo del 100%.
In tabella 2 viene mostrata la distribuzione dei sierotipi/pulsotipi (subtipi) dei ceppi isolati dai diversi lotti e dalle diverse fasi di prelievo negli stabilimenti considerati.
Nel dendrogramma una linea tratteggiata mette in evidenza i due lineage evolutivi riconosciuti nella specie *L.m.* Il lineage I comprende solo 2 ceppi del pulsogruppo D, mentre tutti gli altri ceppi si ritrovano all'interno del lineage II (Figura 2).

DISCUSSIONE

I risultati delle prove hanno evidenziato il sierotipo 1/2a come predominante (53.8%) rispetto agli altri individuati (1/2c, 1/2b e 4b).
La PFGE dei 26 ceppi ha confermato l'estrema variabilità genetica della *L.m.* (18 pulsotipi). All'interno di uno stabilimento e di uno stesso lotto di produzione, infatti, sono sempre stati isolati più subtipi. Nello stabilimento 2, inoltre, dallo stesso lotto di produzione sono stati isolati ceppi con identico subtipo in diversi giorni di prelievo. Stessa situazione è stata riscontrata per lo stabilimento 4. Negli stabilimenti 2 e 4 sono stati isolati ceppi con lo stesso subtipo e analoga situazione si è verificata per gli stabilimenti 3 e 4. Questa analogia dei ceppi potrebbe far pensare ad una sorgente comune di contaminazione. La presenza di *L.m.* nell'industria alimentare, può essere associata all'ingresso del patogeno con le materie prime e alla sua persistenza sulle superfici di lavorazione e nell'ambiente. Questo microrganismo, infatti, può facilmente contaminare le materie prime carnee durante la macellazione e, successivamente, persistere a lungo negli ambienti di lavorazione e nei prodotti data la sua capacità di sopravvivere e moltiplicarsi. Per gli stabilimenti oggetto di questa indagine tale evenienza si può escludere in quanto lo stesso subtipo non è stato nel tempo mai reisolato da lotti diversi.

BIBLIOGRAFIA

1. Blasi G., Lanciotti M., Nardi S., Palombo B., Ferretti E., Di Giacomo L., Verdecchia E., Finazzi G., Pezzotti G. 2008. Ciabuscolo: definizione di standard di processo e di prodotto. Studio preliminare. A.I.V.I. 1.1/08: 63-64.
2. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 3819-3822.
3. Graves L.M. and Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology, 65, 55-62.

***Tabella 2**. Distribuzione dei pulsotipi e dei sierotipi nell'ambito degli stabilimenti*

Stabilimento		Impasto	24h	48h	5gg	10gg	20gg	30gg	40gg
1	LT I	18 (1/2a)	-	5 (1/2a)	1 (4b)	-	-	-	-
	LT II	-	-	-	-	-	-	6 (1/2a)	17 (1/2b)
	LT III	-	-	-	-	-	-	-	-
2	LT I	-	-	-	-	-	-	-	-
	LT II s	-	-	12 (1/2c)	12 (1/2c)	12 (1/2c)	-	-	-
	LT II b		-	-	12 (1/2c)	-	-	13 (1/2c)	-
	LT III	14 (1/2c)	14 (1/2c)	-	-	16 (1/2a)	-	-	11 (1/2a)
3	LT I	-	-	-	-	-	-	-	-
	LT II	-	-	-	-	2 (4b)	4 (1/2a)	-	-
	LT III	-	-	-	-	-	-	-	-
4	LT I	15 (1/2a)	4 (1/2a)	4 (1/2a)	7 (1/2a)	4 (1/2a)	-	3 (1/2c)	-
	LT II	9 (1/2a)	-	-	-	-	-	-	-
	LT III	8 (1/2a)		10 (1/2a)	-	-	-	-	14 (1/2c)

***Legenda: LT:**Lotto, **s**: budello suino; **b**: budello bovino*

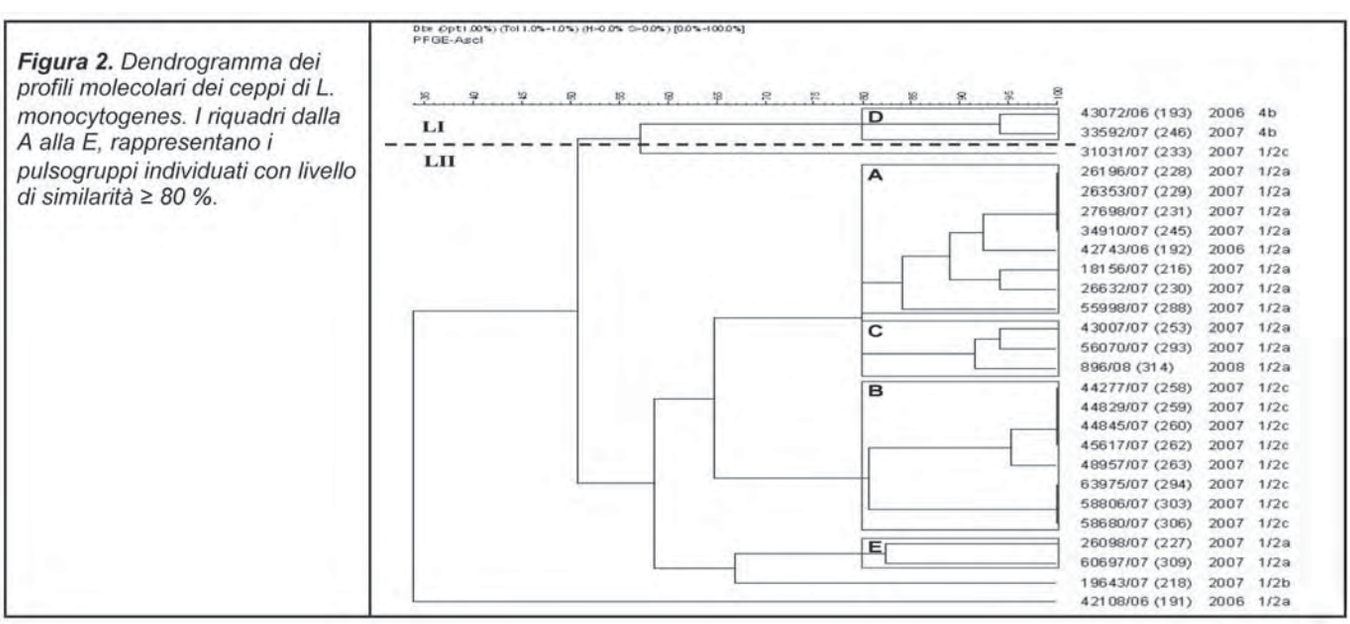


***Figura 2.** Dendrogramma dei profili molecolari dei ceppi di L. monocytogenes. I riquadri dalla A alla E, rappresentano i pulsogruppi individuati con livello di similarità ≥ 80 %.*

IMPIEGO DI UNA METODICA IN CHEMILUMINESCENZA PER IL DOSAGGIO PLASMATICO DELLA TROPONINA I (cTnI) NELLE AFFEZIONI CARDIACHE DEL CAVALLO

Passeri B., Fusari A., (*) Aloe R., Ubaldi A.
Dipartimento di Salute Animale. Università degli Studi di Parma
(*) Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio – Azienda ospedaliera universitaria - Parma

Key words: Troponina I, cavallo, cardiopatie

SUMMARY:
Plasma cardiac Troponin I (cTnI) concentration in cardiopathic and health horses was measured using an human immunoassay method in chemiluminescence (Access Accu TnI Immunoassay System, Beckman Coulter, Inc.). The aim of the trial was to evaluate the applicability of the chemiluminescent method also in animal, in order to apply the new method in diagnostic practice of heart diseases. The experimental data show good reproducibility and precision in plasma horse, also. It is possible to stress that freezing plasma samples do not interfere with the analytical performances of the new method.

INTRODUZIONE

La Troponina è un complesso proteico composto da 3 subunità polipeptidiche; TnI (Troponin-inhibitory-component) che inibisce l'attività dell'ATPasi del complesso actina-miosina in assenza di calcio, e quindi previene la contrazione muscolare; TnT (tropomyosin-binding-component) che collega il complesso della Troponina con la tropomiosina; TnC (calcium-binding-component) che reperisce il calcio per la contrazione Sono state identificate tre isoforme di Troponina I:
- Troponina I rapida (fs TnI) e la Troponina I lenta (ss TnI) con peso molecolare di 19800 Da ciascuna, espresse nelle fibre dei muscoli scheletrici, rispettivamente a mioclonia lenta e rapida;
- Troponina I cardiaca (cTnI) con peso molecolare di 24000 Da.

E' stato ampiamente documentato che la cTnI è specifica del miocardio, poiché il muscolo scheletrico non esprime questa isoforma, né durante lo sviluppo, né in risposta a stimoli (1).
Nei mammiferi le tre isoforme di Troponina sono codificate da geni dissimili, di conseguenza la diversa composizione aminoacidica della proteina permette la differenziazione di queste molecole attraverso tecniche immunologiche (Anticorpi monoclonali per la cTnI) (2).
Pertanto, la cardiospecificità della cTnI consente di distinguere fra le lesioni cardiache e scheletriche e permette quindi di differenziare l'infarto miocardico da lesioni muscolari.
La Troponina I è una proteina lineare dotata di cinque alfa eliche, costituita da 211 aminoacidi e una sequenza addizionale di 31 aminoacidi a livello della regione N terminale, caratteristica che la differenzia dai suoi analoghi scheletrici.
Nelle cellule miocardiche, la Troponina I è contenuta, per la maggior parte, in strutture delimitate e, in misura ridotta, libera nel citosol; questa distribuzione cellulare determina un rilascio precoce della quota libera (3)
La concentrazione di cTnI aumenta nel plasma ogniqualvolta si manifesti un danno cardiaco. Esiste inoltre una associazione tra la portata del danno cardiaco e la concentrazione di cTnI in situazioni patologiche acute (5)
La presente ricerca è volta a valutare l'applicabilità del kit predisposto per la specie umana nella specie equina, per la quale è necessario dimostrare l'applicabilità, la riproducibilità, la precisione e la robustezza della metodica, in conformità con quanto prescritto dai protocolli internazionali.

MATERIALI E METODI

Animali. Da due soggetti affetti da sofferenza cardiaca sono stati prelevati 10 ml di sangue in provette da prelievo contenenti litio-eparina dopo 4 giorni dall'ospedalizzazione. Il plasma ottenuto dopo centrifugazione è stato refrigerato a +4°C ed analizzato entro 12 ore dal prelievo. Un'aliquota di plasma del secondo cavallo, che presentava la concentrazione maggiore di Troponina I, è stato stoccato a -25°C per quattro anni e analizzato nuovamente con la stessa metodica e la stessa attrezzatura di laboratorio.
Come gruppo controllo sono stati presi in considerazione 12 cavalli da fondo, regolarmente allenati e senza patologie cardiache in atto. I loro campioni biologici sono stati sottoposti alle medesime condizioni sperimentali.
Metodo di analisi. La tecnica diagnostica usata per la misurazione della cTnI nel cavallo è la stessa applicata nell'uomo: infatti, gli anticorpi monoclonali usati nella ricerca della cTnI nell'uomo non sono specie-specifici e non cross-reagiscono con le isoforme di Troponina presenti nel muscolo scheletrico (4).
La cTnI è stata valutata con dosaggio immunoenzimatico a doppio sito ("sandwich") in chemiluminescenza in fase solida. Ad una cuvetta di reazione si aggiunge il campione di plasma insieme al coniugato anticorpi monoclonali anti cTnI-fosfatasi alcalina e particelle paramagnetiche rivestite di anticorpi monoclonali anti cTnI. La cTnI nel campione ignoto si lega agli anticorpi cTnI sulla fase solida, mentre il coniugato anticorpo anti-cTnI-fosfatasi alcalina reagisce con i siti antigenici diversi sulle molecole di cTnI. Dopo l'incubazione nella cuvetta di reazione, la separazione in un campo magnetico ed il lavaggio, si rimuovono i materiali non legati alla fase solida. Un substrato chemiluminescente è aggiunto alla cuvetta e la luce generata dalla reazione è misurata con un lumenometro. La quantità di luce prodotta è direttamente proporzionale alla concentrazione di cTnI presente nel campione *("ACCESS Immunoassay System ACCU TnI; Beckman-Coulter 2001).*
Unità di misura e valori normali. I valori rilevati sono espressi in ng/ml e il livello basale è prossimo allo 0 nel cavallo, come è stato registrato nel gruppo controllo dei 12 soggetti sani.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati sperimentali consentono due tipi di valutazione: la riproducibilità del metodo su plasma "fresco" e su plasma "conservato", qualora si ritenga necessario congelare i campioni di plasma, al fine di ripetere le prove di laboratorio a tempi successivi e comparativi.
Nella tabella n.1 sono riportati i dati delle prove di tipo "ripetute".
Dalla disamina dei risultati analitici e dalla trattazione statistica si evince che i valori di deviazione standard nei due casi studiati sono molto simili, a conferma che la metodica in chemioluminescenza possiede delle performance di riproducibilità da ritenersi ottime. I due valori medi, corrispondenti ai due soggetti sottoposti a studio, mostrano

la diversa gravità della patologia presente e conforme ai rilievi clinici raccolti. A parità di valore della DS, quindi, il livello superiore di troponina I nel plasma condiziona la precisione delle analisi. Maggiore è la concentrazione plasmatica della proteina, maggiore sarà l'accuratezza della prova di laboratorio. I valori di CV avvalorano l'osservazione ed indicano che la dispersione dei dati rispetto al valore medio è decisamente più alta per il plasma del primo cavallo rispetto al secondo congelato.

Tabella n.1 Valori medi e di deviazione standard (DS) delle prove di ripetibilità su plasma di cavalli.

n° della prova	1°cavallo (ng/ml)	2° cavallo (ng/ml)
1	1.16	4.32
2	1.22	4.10
3	1.24	4.00
4	0.95	4.22
5	1.25	4.01
6	1.30	4.14
Val. medio	***1.187***	***4,132***
D.S.	***0.124***	***0.123***
C.V.	***10.49***	***2.97***
Val. max	1.30	4.32
Val. min.	0.95	4.00

Il campione di plasma congelato al momento del prelievo (nel 2005) presentava un valore medio di 5.01, con un CV di 2.87, pertanto a distanza di quattro anni la concentrazione di troponina I ha subito una diminuzione del 17.4%. Il dato è confortante qualora si vogliano ripetere le prove sui plasma vecchi congelati per ragioni di studio od altro. Inoltre, i dati sperimentali dimostrano la riproducibilità della metodica che a distanza di anni e dopo stoccaggio a -25°C fornisce performance ancora apprezzabili in base ai parametri di validazione.
E' utile ricordare che sono stati scelti due soggetti portatori di patologia e quindi con valori misurabili nel plasma, mentre i dodici cavalli sani studiati (gruppo controllo) non presentano livelli di Troponina I misurabile nel plasma. Ciò avvalora l'applicabilità della metodica nei cavalli patologici e l'utilità diagnostica che ne deriva, stante la difficoltà diagnostica, sul piano clinico e laboratoristico, delle patologie cardiache se affrontate con metodi tradizionali.

CONCLUSIONI

La diagnostica di laboratorio ha sempre presentato dei limiti di efficacia nella definizione quantitativa e differenziale delle patologie cardiache nel cavallo. La difficoltà derivava essenzialmente dalla natura dei metodi di analisi che possedevano una scarsa specificità per le alterazioni proprie dell'apparato cardiaco.
I primi test di valutazione delle alterazioni cardiache furono gli enzimi creatinchinasi (CK o CPK) e la transaminasi glutammico ossalacetica o aspartato transferasi (GOT o AST). Gli studi sulla esistenza e la caratterizzazione degli isoenzimi ha ampliato la specificità dei due enzimi citati, dimostrando che un isoenzima della GOT e l'isoenzima MB della CK vantavano una derivazione prettamente miocardica, che ha permesso di avanzare una diagnosi di laboratorio di interessamento cardiaco più accurata rispetto all'analisi delle attività totali dei due enzimi.
Nonostante gli innegabili progressi diagnostici raggiunti con l'impiego della tecnica degli isoenzimi, il clinico veterinario chiedeva ulteriori affinamenti di diagnosi strumentale, pertanto, la ricerca scientifica nel settore della biochimica clinica ha ampliato i confini diagnostici introducendo un nuovo parametro denominato Troponina I (cTnI). Questa isoforma proteica è specifica del miocardio, poiché il muscolo scheletrico non esprime questa isoforma, né durante lo sviluppo, né in risposta a stimoli, e raggiunge lo scopo di evidenziare solamente l'alterazione cardiaca in atto con estrema specificità e buona precisione analitica.
L'adattabilità dei metodi diagnostici dalla medicina umana alla medicina veterinaria è un prezioso ausilio del quale il veterinario può avvalersi per l'accertamento di un sospetto diagnostico formulato in sede di diagnosi clinica.
Negli animali sportivi è importante poter contare su un marker diagnostico di patologia cardiaca precoce, preciso e, soprattutto affidabile che consenta la formulazione della diagnosi con stretto margine di errore. La Troponina I è utilizzata ormai in modo routinario in medicina umana, ma non così in medicina veterinaria. Il mantenimento della struttura proteica della Troponina I cardiaca attraverso le specie, consente l'utilizzo della metodica in chemiluminescenza utilizzata in medicina umana che si avvale di anticorpi monoclonali non specie-specifici.
Le prove di ripetibilità e riproducibilità verificate, seppur su un numero limitato di ripetizioni, dimostrano la precisione (ripetibilità e riproducibilità) del metodo espressa da un basso CV, soprattutto quando la Troponina I sia dosata in campioni di plasma provenienti da animali con patologia in atto di media ed elevata gravità. Infatti, i dosaggi determinati sul plasma del cavallo n.2, che presentava al momento del valori decisamente più elevati rispetto al cavallo n.1, presentano un valore di CV tale da confermare la precisione del metodo adottato.
La metodica qui presentata si basa sulla tecnica della chemioluminescenza, che esige dei costi di esecuzione ritenuti maggiori rispetto alle metodiche di analisi sopra citate per la diagnostica cardiaca. Il costo però diviene un fattore meno limitante se si pone come priorità la proporzionalità dei livelli plasmatici di Troponina I e la gravità della lesione cardiaca e, concludendo, l'accuratezza e l'efficacia diagnostica

REFERENCES

1) Mair J., Genser N., Morandell D. (1996); Cardiac Troponin I In The Diagnosis Of Myocardial Injury And Infarction; Clim Chim Acta; 245, 19-38.

2) Coudrey L.;The Troponins ; Arch Intern Med/ Vol 158 ; June 8,1998; 1173-1180.

3) Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Winand, N.J., Wootton, J.A.M., 2004. Cloning And Sequencing Of The Canine And Feline Cardiac Troponin I Genes. Am. J. Vet. Res. 65, 53–58.

4) O'brien, P.J., Landt, Y., Ladenson, J.H., 1997. Differential Reactivity Of Cardiac And Skeletal Muscle From Various Species In A Cardiac Troponin I Immunoassay. Clinical Chemistry 43, 2333–2338.

5) Passeri B., Fusari A.,. Ubaldi A, Leonardi F., Cantoni AM., Ferrari M., Botti P., Corradi C.. Cardiac Troponin I (Ctni) In A Sheep Experimental Model With Induced Myocardial Ischemia. 7th European Congrss On Comparative And Veterinary Clinical Pathology, 21-24 June 2005, P. 111.

INDAGINE SUL RUOLO DI AGENTI EZIOLOGICI FUNGINI NEL DETERMINISMO DELLA MASTITE BOVINA

Peano A.[1], Molinar Min A.R.[1], Mastromatteo G.[1], Laurenti M.[2], Mosso P.[2], Rambozzi L.[1]
[1]Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Settore Parassitologia, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO);
[2]Associazione Provinciale Allevatori – Sezione di Cuneo

Keywords:*Candida* spp., bovini, latte

INTRODUZIONE

La mastite bovina è una patologia che riveste un notevole interesse dal punto di vista zootecnico dato che la sanità e funzionalità dell'apparato mammario influenzano la qualità igienico-sanitaria del latte con una ripercussione su quantità e qualità dei prodotti trasformati e, quindi, la redditività finale della produzione lattiero-casearia.
La mastite può avere diversi livelli di gravità, potendosi presentare in modo clinicamente evidente, talora con risentimento generale dell'animale, o in modo subclinico. In parallelo possono già essere evidenti macroscopiche alterazioni della secrezione lattea oppure queste vengono svelate con test di screening in laboratorio. In questo senso un parametro di grande interesse normalmente applicato su campo è rappresentato dalla conta delle cellule somatiche. Perdite economiche si hanno comunque anche per forme subcliniche di mastite, per la diminuita produzione di latte il quale oltretutto generalmente risulta inadatto alla produzione di derivati caseari, principalmente per modifiche nella proporzione dei diversi contenuti chimici.
Nelle nostre realtà zootecniche la mastite è in genere riconducibile ad una serie di concause di tipo gestionale con la frequente partecipazione di agenti patogeni di natura batterica. D'altra parte, in alcuni lavori in precedenza pubblicati si è evidenziato il ruolo di alcune specie fungine, soprattutto lieviti, nel determinismo di mastite bovina. Questi agenti eziologici risultano ritrovati nel latte mastitico con frequenza notevolmente inferiore rispetto ai batteri, ma la prevalenza con cui si possono ritrovare in mammella e la loro "reale" patogenicità in quel contesto sono fattori non del tutto chiariti. Risulta anche poco delineata la descrizione della "flora" fungina presente nel latte di bovine sane. Alcune specie fungine potrebbero essere infatti ritrovabili nel latte solo in qualità di saprofiti/inquinanti senza alcuna valenza patogena per il parenchima mammario né alcun effetto sulla caseificazione del latte.
Scopo del presente lavoro è la valutazione della presenza di funghi in campioni di latte bovino ed il loro potenziale ruolo nel determinismo di processi infiammatori a carico della mammella.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati i singoli quarti mammari di 365 bovine (1460 campioni di latte), da 34 aziende zootecniche di diverse Province piemontesi, dal Gennaio al Dicembre 2008.
I campioni sono stati seminati entro le 24 ore successive al prelievo (Sabouraud-Agar-Cloramfenicolo-Gentamicina) e incubati a 37°C per almeno una settimana. Le colonie riconosciute come lieviti (sottoposte ad esame microscopico in blu lattofenolo) sono state isolate in purezza mediante trapianto su terreno di Sabouraud destrosio per 48 h a 37 °C, e successivamente identificate su base biochimica (ID32C - Bio Mèrieux).
Il numero di cellule somatiche (SCC) è stato utilizzato come indicatore indiretto dello stato di salute della mammella. I campioni sono stati suddivisi in 3 gruppi in relazione al numero di cellule somatiche (<300.000: gruppo A; 300.000-700.000: gruppo B; >700.000: gruppo C).

Risultati
Quindici capi (4,1%) sono risultati positivi per la presenza di funghi nel latte, per un totale di 19 isolamenti. La tipizzazione ha consentito di identificare 7 diverse specie, tutte appartenenti al genere *Candida: C. albicans* (5%)*, C. famata* (5%)*, C. catenulata* (16%)*, C. guillermondii* (5%)*, C. rugosa* (11%)*, C. humicola* (5%)*, C. lipolytica* (37%). Centosessantotto capi testati (46%) sono risultati positivi all'esame batteriologico, per un totale di 195 isolamenti: *Staphylococcus aureus (N=53), Streptococcus uberis (N=16), Streptococcus* spp. (N=52)*, Staphylococcus* spp. (N=28)*, Streptococcus agalactiae* (N=19)*, non identificato* (N=9)*, Pasteurella multocida* (N=3)*, Escherichia coli* (N=4)*, Corynebacterium* spp. (N=6)*, Streptococcus dysgalactiae* (N=4), *Enterobacteriaceae* (N=1).
Dal conteggio delle cellule somatiche emerge che, a differenza di quanto avviene per le infezioni batteriche (R^2= 0,83), non esiste una correlazione significativa tra la presenza di lieviti e l'aumento del numero delle cellule somatiche (R^2= 0,12). In Tab. 1 sono riportati i dati relativi agli esiti batteriologici e micologici associati alla suddivisone in gruppi in base al numero delle cellule somatiche.

Tab.1- Capi positivi all'esame batteriologico e micologico nei 3 gruppi di animali suddivisi in base alle cellule somatiche.

Cellule somatiche	Tot campioni	Esame batteriologico positivo (%)	Esame micologico positivo (%)
<300.000	187	31,0	4,8
300.000-700.00	77	59,7	2,6
>700.000	101	63,4	4,0
Totale	365	46,0	4,1

DISCUSSIONE

Le mastiti ad eziologia fungina hanno acquisito nel tempo una maggiore importanza, sia come agenti eziologici primari che secondari. Nel primo caso sono spesso causate da agenti infettanti altamente virulenti, quali Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus e Candida krusei. Nelle mastiti micotiche secondarie, che in genere seguono una mastite primaria di origine batterica o si verificano dopo la somministrazione intramammaria di antibiotici, le specie fungine sono molto più variabili, con una netta prevalenza dei lieviti.
Ad oggi, almeno 26 specie di lieviti sono stati associati nel tempo, come agenti eziologici primari o secondari, a mastite bovina (9).
Il nostro studio ha evidenziato la presenza di lieviti nel latte del 4,1% dei bovini esaminati. Il dato risulta solo parzialmente confrontabile con quelli riportati in letteratura; la maggior parte dei lavori, infatti, si riferisce ad indagini effettuate su un campione "selezionato" su base clinica, ad esempio solo animali con mastite clinica, subclinica o con resistenza alla terapia antibiotica (6). Inoltre, condizioni geografiche, ambientali e gestionali possono influenzare profondamente la diffusione e la prevalenza delle differenti specie fungine.

Le prevalenze riportate in letteratura variano dal 2 al 19% in studi effettuati in Europa ed in altre parti del mondo (10).
In questo studio sono state isolate 7 differenti specie di *Candida***;** sei di queste sono già state segnalate come agenti o co-agenti eziologici di mastite bovina: *C. albicans* (2,4,5,8), *C. rugosa* (1, 4, 9), *C. humicola* (4,8), *C. catenulata* (1,2), *C. guillermondii* (8,9) **e** *C. famata* (2).
Per quanto riguarda *C. lipoytica* non ci risultano segnalazioni definitive come patogeno mammario.
Solo *C. albicans* è riportata in letteratura come agente eziologico primario per mastite (5,8), mentre per le altre specie, dato che sono sempre state isolate insieme ad altri lieviti o a batteri, si può solo presupporre un ruolo secondario.
Nel presente lavoro abbiamo utilizzato il numero di cellule somatiche come indicatore indiretto dello stato di salute della mammella; l'infezione mammaria, infatti, provoca un afflusso di leucociti dal sangue, a cui si affianca l'alterazione della funzionalità secretoria delle cellule mammarie ed il conseguente cambiamento nel volume e nella composizione del latte , di cui le cellule somatiche sono indice.
Anche se nell'80% dei casi un quarto sano produce un latte con meno di 100.000 cs/ml, un quarto mammario è considerato normale quando produce un latte con meno di 300.000 cs/ml; fino a 700.000cs/ml indicano un quadro di mastite clinica, oltre questo valore la mammella è considerata gravemente compromessa.
Dai risultati ottenuti emerge che, a differenza di quanto avviene per le infezioni batteriche, non esiste una correlazione tra la presenza di lieviti e l'aumento del numero delle cellule somatiche. Suddividendo i capi testati in tre classi in base al numero di cellule somatiche il 63,4% dei capi positivi all'esame batteriologico presenta valori >700.000 cs/ml, il 59,7% valori tra 300.000 e 700.000 cs/ml, il restante 31% valori <300.000 cs/ml. Dall'analisi dei dati risulta una correlazione statisticamente significativa tra il numero di cellule somatiche e l'infezione batterica (rho=1).
Da un'analoga suddivisione dei 15 capi risultati positivi all'esame micologico, il 4,8%, il 2,6% ed il 4% presentano rispettivamente valori <300.000 cs/ml, tra 300.000 e 700.000 cs/ml e > 700.000 cs/ml, senza alcuna correlazione statistica tra il numero di cellule somatiche e la presenza di lieviti (rho=-5).
Il nostro studio, quindi, indica come le normali analisi di routine, quale il conteggio delle cellule somatiche, non permettano di evidenziare l'eventuale presenza di lieviti; da un punto di vista sanitario questo non rappresenta un rischio, visto che i funghi isolati non sono agenti di zoonosi primaria, ma potenziale causa di patologie solo in persone immunodepresse (7).
Inoltre i lieviti non resistono ai trattamenti termici, per esempio la pasteurizzazione, quindi l'eventuale rischio esisterebbe al limite per consumo di latte crudo e prodotti derivati.
In conclusione, nella nostra realtà zootecnica i lieviti risultano avere una scarsa rilevanza nel determinismo di mastite bovina e non rappresentano un rischio per la salute del consumatore**.**

BIBLIOGRAFIA

(1) Aalbaek B., Stenderup J. (1994). "Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark." Apmis 102(6): 451-6.
(2) Costa E. O., Gandra C. R. et al. (1993). "Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Sao Paulo, Brazil." Mycopathol 124(1): 13-7.
(3) Dion W. M. e Dukes T. W. (1982). "Candida rugosa: experimental mastitis in a dairy cow." Sabouraudia 20(2): 95-100.
(4) Krukowski H., Lisowski A. (2006). "Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland." Pol J Vet Sci 9(3): 181-4.
(5) Moretti A., Pasquali P. (1998). "Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria)." Zentralbl Veterinarmed B 45(3): 129-32.
(6) Pfaller M. A., Diekema D. J., Messer S.A., Boyken L., Hollis R. J. e Jones R. N. (2004). „In vitro susceptibilities of rare Candida bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents." Diagn Microbiol Infect Dis. 48: 101-5.
(7) Radosavljevic M., Koenig H., Letscher-Bru V., Waller J., Maloisel F., Lioure B. e Herbrecht R. (1999). „Candida catenulata Fungemia in a Cancer Patient." J Clin Microbiol. 37(2): 475-7.
(8) Santos R.C., Marin J.M. (2005). «Isolation of Candida spp. From mastitic bovine milk in Brazil.» Mycopathol (159): 251-3.
(9) Spanamberg A., Wunder E. A. Jr. (2008). „Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil." Rev Iberoam Micol 25(3): 154-6.
(10) Williamson J. H. e di Menna M. E. (2007). "Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources." N Z Vet J 55(4): 188-90.

ISOLATION OF YEASTS IN BOVINE MILK IN NORTH-WESTERN ITALY

The objective of this work was to characterize the yeasts associated with milk of cows in herds in NW Italy.
Udder quarter milk samples (n = 1460) collected between January and December 2008 on 34 dairy farms were examined. A total of 19 yeast isolates was subjected to the yeast differentiation assays. All of the isolates were yeasts of the genera Candida: *C. albicans, C. famata, C. catenulata, C. guillermondii, C. rugosa, C.humicola, C. lipolytica*. The presence of yeasts is no correlated to an increase of somatic cell counts.

FOCOLAIO DI BVD-MD IN UN ALLEVAMENTO BOVINO AD ALTA PRODUZIONE IN PIEMONTE

Pitti M.[1,2],Rossi F.[1], Beccaria D.[3], Zoppi S.[1], Peletto S.[1], Bertola G.[3],Masoero L.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta
[2]V.S.A. - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano
[3]A.s.l. CN1- Mondovì

Key words: BVDV; ceppo citopatogeno; infezione persistente.

ABSTRACT
In the BVD-infected herd, described in this report, virological and serological tests (indirect and direct ELISA tests) were performed in order to detect persistent infected animals (PI). Bacteriological, virological and biomolecular examinations were also perfomed on aborted fetuses and on animals deceased with BVD-MD pathognomonic symptoms.
The application of this diagnostic protocols allowed to identify 16 PI animals and to isolate a BVD cytopathogenic strain, subtype 1e.

INTRODUZIONE
Il virus della diarrea virale bovina (BVDV), isolato per la prima volta nel 1946 (4), è associato a varie forme morbose che comprendono infezioni subcliniche, immunodepressione, forme respiratorie, forme intestinali e disturbi della sfera riproduttiva (1). BVDV appartiene alla famiglia Flaviviridae, genere Pestivirus, che comprende il virus della peste suina classica (CSFV), il virus della border disease (BDV) e due distinti genotipi di BVDV, tipo 1 e tipo 2. BVDV è un virus ad RNA monocatenario a polarità positiva, codificante per una poliproteina che è scissa, ad opera di proteasi cellulari e virali, in proteine strutturali (C, Erns, E1, E2) e non strutturali (Npro, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (2). Entrambi i genotipi BVDV possono manifestare due diversi biotipi, citopatogeno (cp) e non citopatogeno (ncp), in base all' attitudine a causare o meno alterazioni delle colture cellulari infette (effetto citopatico).
Nel 2006 è stato attivato in Piemonte il progetto "Definizione di protocolli diagnostici integrati di sanita' pubblica veterinaria in allevamenti bovini da riproduzione ad alta produzione" con l'intento di verificare la prevalenza della BVD sul territorio regionale e di mettere a punto un protocollo diagnostico finalizzato all'individuazione dei capi persistentemente infetti (PI), principali responsabili del mantenimento dell'infezione in allevamento.
L'infezione da BVDV nell'azienda oggetto di questo studio è stata individuata nel 2007 in seguito al riscontro di ricorrenti episodi di mortalità neonatale e di aborti; tale allevamento è stato quindi inserito nell'ambito dell'attività diagnostica del progetto.
L'obiettivo del presente lavoro è la descrizione del protocollo diagnostico approntato.

MATERIALI E METODI
L'azienda in esame alleva bovini di razza piemontese ad alta genealogia, con un effettivo pari a 236 capi.
Dai riscontri anamnestici non risultano episodi pregressi di infezione da BVDV ed è stata praticata la profilassi vaccinale a partire dal mese di giugno 2007 utilizzando vaccino spento Bovilis BVD, con richiami semestrali.
Nel periodo aprile-luglio 2007 si sono verificati 13 episodi di aborto; tre feti sono stati sottoposti ai seguenti accertamenti: esame necroscopico, esame batteriologico, ricerca di *Brucella spp.*, *Campylobacter foetus*, *Chlamidophyla spp.*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, virus respiratori, ricerca dell'antigene BVDV NS3 con metodica ELISA (Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen/leukocytes ELISA test kit [HerdChek, Idexx]), ed esame micologico. Dalla milza si è proceduto all'isolamento virale di BVDV su monostrato di cellule MDBK.
In seguito si è proceduto all'esame virologico su tutti i capi presenti in allevamento con metodica ELISA per la ricerca dell'antigene virale Erns (Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen Test Kit/Serum Plus [HerdChek, Idexx]).
Sui campioni positivi all'ELISA-AgErns, è stata eseguita la ricerca di anticorpi diretti contro la proteina virale NS2-3 con metodica ELISA (Pourquier ELISA BVD/MD/BD P80 antibodies screening kit).
Tutte le metodiche ELISA sono state eseguite secondo le istruzioni del produttore.
Per la verifica definitiva dello stato di PI di tali capi, l'esame virologico (ELISA-AgErns su siero e cute auricolare) e sierologico (ELISA-AcNS2-3) sono stati ripetuti due volte a distanza di 21 giorni.
Su alcuni capi deceduti si è proceduto all'esame necroscopico, all'esame virologico su milza con l'ELISA-AgNS3 e all'isolamento virale da milza.
E' stato estratto l'RNA virale da due campioni di milza ed è stata eseguita l'amplificazione tramite RT-PCR.
I ceppi di BVDV isolati sono stati sottoposti ad analisi filogenetica sequenziando un frammento di 288bp della regione 5'UTR.

RISULTATI
L'esame necroscopico dei tre feti ha evidenziato la presenza di liquido siero-emorragico in cavità addominale, lieve degenerazione epatica e, in un caso, modica enterite.
Di tutti gli accertamenti previsti dal protocollo diagnostico applicato ai feti, solo l'ELISA-AgNS3 e l'isolamento di BVDV da milza sono risultati positivi.
L'esame virologico sulla totalità dei capi ha dato esito positivo in 21 casi. Su tali campioni la ricerca di anticorpi anti-BVDV ha evidenziato positività in 16 animali mentre 5 sono risultati sieronegativi (Tab.1).
Al secondo esame virologico sono stati ritestati solo 17 dei 21 capi in quanto 4 animali erano deceduti con sintomi riconducibili a malattia delle mucose. Sono risultati positivi 16 sieri che testati per la ricerca anticorpi hanno dato esito positivo in 9 casi e negativo in 7.
Al terzo esame virologico sono stati testati solo 13 capi perchè 4 capi erano stati venduti. Dei 12 animali positivi all'ELISA-AgErns, 9 sono poi risultati negativi all'esame sierologico.
I risultati dei test effettuati hanno permesso di individuare 5 animali PI (positivi all' ELISA-AgErns e negativi all' ELISA-AcNS2-3) al primo ciclo di screening, 5 animali PI al secondo ciclo e 6 al terzo, per un totale di 16 animali PI.
La prevalenza intrallevamento dei capi PI è risultata quindi essere pari al 6,78% (IC95% 3,57%-9,99%).
Su due capi deceduti dopo il primo screening l'esame necroscopico ha evidenziato erosioni gengivali e lesioni emorragiche a livello di esofago, abomaso ed intestino.
L'isolamento virale e l'RT-PCR, eseguiti a partire da tessuto splenico, hanno dato esito positivo.
L'analisi filogenetica ha evidenziato l'appartenenza dei due ceppi di BVDV isolati al sottotipo 1e.

DISCUSSIONE

L'iter diagnostico di screening applicato sull'effettivo aziendale è risultato efficace nell'individuazione dei capi PI presenti.

La ripetizione dei test ELISA, ad intervalli di tempo prestabiliti (21 giorni circa), ha permesso di evidenziare lo stato anticorpale dei soggetti testati monitorando la progressiva scomparsa dell'immunità passiva colostrale.

Tab.1 Screening virologici e sierologici eseguiti.
(DEC=soggetto deceduto; VEND=soggetto venduto;
/ =esame non eseguito)

	1° ELISA		2° ELISA		3° ELISA		Capi PI
CAPO	Ag Erns	Ac pNS2-3	Ag Erns	Ac pNS2-3	Ag Erns	Ac pNS2-3	
1	POS	POS	NEG	/	NEG	POS	
2	**POS**	**NEG**	DEC	/	/	/	x
3	**POS**	**NEG**	DEC	/	/	/	x
4	**POS**	**NEG**	DEC	/	/	/	x
5	POS	POS	POS	POS	**POS**	**NEG**	x
6	**POS**	**NEG**	**POS**	**NEG**	**POS**	**NEG**	x
7	POS	POS	**POS**	**NEG**	VEND	/	x
8	POS	POS	**POS**	**NEG**	VEND	/	x
9	POS	POS	**POS**	**NEG**	**POS**	**NEG**	x
10	**POS**	**NEG**	**POS**	**NEG**	VEND	/	x
11	POS	POS	**POS**	**NEG**	VEND	/	x
12	POS	POS	POS	POS	**POS**	**NEG**	x
13	POS	POS	POS	POS	**POS**	**NEG**	x
14	POS	POS	POS	POS	**POS**	**NEG**	x
15	POS	POS	POS	POS	POS	POS	
16	POS	POS	POS	POS	POS	POS	
17	POS	POS	POS	POS	POS	POS	
18	POS	POS	**POS**	**NEG**	**POS**	**NEG**	x
19	POS	POS	POS	POS	**POS**	**NEG**	x
20	POS	POS	POS	POS	**POS**	**NEG**	x
21	POS	POS	**DEC**	/	/	/	?

Cinque soggetti risultati sieropositivi al primo ciclo di screening si sono negativizzati al secondo controllo; sette animali, in cui era stata evidenziata una risposta anticorpale ai primi due controlli, sono risultati sieronegativi al terzo ciclo di screening.

La prevalenza intrallevamento di capi PI del 6,78% rilevata è sensibilmente superiore al dato medio del 1-2% riportato in letteratura (3).

Un diciassettesimo soggetto, risultato positivo sia all'ELISA Ag Erns che all'ELISA AcNS2-3 del primo ciclo di screening, è deceduto prima dell'esecuzione degli ulteriori accertamenti con sintomatologia riferibile a BVDVcp. Seppur senza possibilità di conferma sierologica questo capo potrebbe essere considerato PI ai fini delle valutazioni epidemiologiche, determinando un ulteriore aumento del tasso di prevalenza intrallevamento.

I rilievi autoptici chiaramente riferibili a malattia delle mucose, evidenziati in due animali deceduti durante il monitoraggio, confermano ulteriormente la circolazione di un ceppo citopatogeno in allevamento.

L'analisi filogenetica, effettuata su due isolati, ha evidenziato la presenza del solo sottotipo 1e; sono in corso ulteriori indagini su campioni dei restanti capi PI per valutare l'eventuale co-presenza di altri sottotipi di BVDV.

I piani di eradicazione della BVD applicati in altri paesi si basano sull'eliminazione dei capi PI (4).

Nell'azienda esaminata, dopo l'allontanamento dei capi PI identificati, non si sono più verificati episodi di aborto imputabili a BVDV ed i controlli effettuati, a cadenza trimestrale, su campioni di cute auricolare dei vitelli di 0-3 mesi di età non hanno rivelato positività.

L'efficacia nell'individuazione degli animali PI del protocollo diagnostico descritto ne rende auspicabile l'applicazione su ampia scala, in vista di futuri piani di controllo di BVD-MD sul territorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Baker J.C. (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhea virus infection. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 11: 425-445;

2. Knipe D.M., Howley P.M. (2007) Fields virology, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 33: 1126-1131;

3. Lindberg A. (2002) Epidemiology and Eradication of Bovine Viral Diarrhoea Virus Infections - Studies on transmission and prenatal diagnosis of persistent infection. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala;

4. Olafson P., MacCallum A.D., Fox F.H. (1946) An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell Vet. 36: 205-210.

RICERCA DELLA GLICOPROTEINA E^{RNS} DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA IN CAMPIONI DI CUTE AURICOLARE E DI SIERO CON METODICA ELISA

Pitti M.[1,2], DeMarco L.[1], Brosio A.[3], Rubinetti F.[1], Gobbi E.[1], Maglione D.[1], Riva A[1], Biosa T.[1], Masoero L.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

[2]V.S.A.- Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

[3]A.s.l. TO3 - Collegno e Pinerolo

Key words: BVDV, ELISA, cute auricolare

ABSTRACT

The identification of BVDV persistent infected cattle can be difficult if animals are tested during the first three months after birth because of colostral immunity interference. An ELISA test to detect the viral protein E^{rns} on ear skin biopsies has been used on 0-3 month old calves to avoid this problem.

The test has been applied on ear biopsies and sera of 248 animals. The ELISA test applied on ear skin samples resulted more sensible. A panel of 33 ear skin, serum and plasma samples was created in order to check the repeatability and reproducibility of the test.

INTRODUZIONE

Il virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) appartiene alla famiglia *Flaviviridae* genere *Pestivirus.* In base alle sequenze nucleotidiche e alle caratteristiche antigeniche sono stati identificati due genotipi: BVDV-1 e BVDV-2, entrambi possono manifestare due fenotipi: citopatogeno (cp) e non citopatogeno (ncp). L'infezione può essere subclinica o produrre diverse manifestazioni cliniche: diarrea virale acuta, sindrome emorragica acuta, aborto, ipofertilità e nascita di vitelli con malformazioni.

La principale fonte di infezione in un allevamento è rappresentata dalla presenza di animali persistentemente infetti (PI), reservoirs naturali ed eliminatori di BVDV. Si ha infezione persistente quando una bovina sieronegativa viene infettata da un ceppo ncp di BVDV nei primi 120 giorni di gravidanza (2). L'allontanamento di tali capi è essenziale per impedire la diffusione del virus in allevamento (1).

Le metodiche comunemente utilizzate in laboratorio per la ricerca di BVDV sono: isolamento virale, ELISA per proteina non strutturale NS3 (ELISA-AgNS3), ELISA per la proteina strutturale E^{rns} (ELISA-AgE^{rns}) e la RT-PCR. L'ELISA-AgNS3 è rivolto verso un proteina virale molto conservata ma ha dei limiti di sensibilità su siero, per questo motivo nei piani di risanamento viene utilizzata l' ELISA-AgE^{rns} , la proteina E^{rns} infatti è presente abbondantemente nel siero (4). Questo test viene utilizzato anche su campioni di cute auricolare.

Tutti i test mostrano un limite di sensibilità se utilizzati sui capi PI nei primi mesi di vita, questi animali ricevono per via colostrale un'elevata quantità di anticorpi materni che portano ad una rapida scomparsa delle particelle virali circolanti (effetto blanketing). Questo effetto comporta la negatività transitoria dei test impiegati per la diagnosi diretta. Dati di letteratura mostrano come si possa ovviare a questo problema utilizzando l'ELISA-AgE^{rns} su frammenti di cute auricolare (3).

Dal 2006 è attivo in Piemonte un progetto regionale dal titolo: "Protocolli diagnostici integrati di sanità pubblica veterinaria in allevamenti bovini ad alta produzione". Nell'ambito del progetto è stato messo a punto un protocollo diagnostico *ad hoc* per l'identificazione dei capi PI.

Obiettivo del presente lavoro è il confronto tra l'utilizzo di un kit commerciale ELISA per la ricerca dell'antigene virale E^{rns} su campioni di cute auricolare e su campioni di siero e la verifica della ripetibilità e riproducibilità del metodo.

MATERIALI E METODI

Nel corso del progetto, presso il Laboratorio di Virologia dell' Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, sono stati analizzati 248 campioni di cute auricolare prelevati da animali di età compresa tra 0 e 3 mesi, appartenenti ad allevamenti positivi monitorati per oltre 1 anno. Per allevamenti positivi si intendono quelli in cui è stato identificato almeno 1 capo PI. Dagli animali è stato prelevato un campione di siero contestualmente al campione di cute auricolare.

E' stato utilizzato il kit "Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus" [HerdChek, Idexx], seguendo le indicazione del produttore. Si tratta di una metodica ELISA cattura o sandwich, in cui anticorpi monoclonali 15c5 per la ricerca della glicoproteina E^{rns} sono adsorbiti sul fondo del pozzetto. La metodica è applicabile su siero, plasma e su frammenti di cute auricolare. Tali frammenti devono avere un diametro di circa 2-3 mm e nei soggetti giovani vengono prelevati utilizzando apposite marche auricolari.

Sono stati quindi selezionati dei campioni per l'allestimento di prove interlaboratorio di ripetibilità e riproducibilità. Per il pannello di campioni di cute sono stati utilizzati i padiglioni auricolari di 6 animali PI e cinque campioni negativi. Tutti i padiglioni sono stati puliti, rasati e suddivisi in frammenti di circa 2-3 mm di diametro. Dei 6 animali PI erano state eseguite precedentemente le seguenti analisi: ELISA-AgE^{rns} nel siero con il kit ELISA "Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Antigen Test Kit/Serum Plus" [HerdChek, Idexx], ricerca di anticorpi anti-BVDV nel siero con il kit "Pourquier ELISA BVD/MD/BD P80 antibodies screening kit", ELISA-AgNS3 in campioni di milza con il "Bovine Viral Diarrhoea Virus Antigen/leukocytes ELISA test kit" [HerdChek, Idexx] e isolamento virale su cellule MDBK da tessuto splenico.

Tutti i kit ELISA sono stati eseguiti seguendo le istruzioni del produttore. Le analisi sul siero erano state ripetute tre volte a distanza di 21 giorni per la conferma dello stato di immunotolleranza.

Su porzioni di cute auricolare di tali animali è stata eseguita la ricerca dell'RNA virale tramite RT-PCR, amplificando un frammento di 288bp del gene 5'UTR.

Sono stati analizzati inoltre 18 campioni di siero (4 positivi e 14 negativi) e 4 campioni di plasma (2 positivi e 2 negativi). E' stato così creato un pannello di 33 campioni che sono stati testati da operatori differenti.

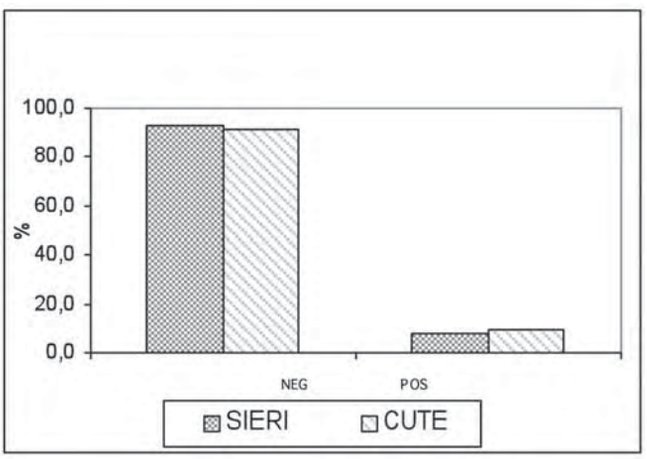
Il grado di accordo tra le prove su cute auricolare e siero e tra le prove di ripetibilità e di riproducibilità è stato valutato calcolando l'indice K di Cohen utilizzando il software Win Episcope 2.0.

RISULTATI

Per quanto riguarda l'applicazione del test ELISA-AgE^{rns} , i campioni di cute analizzati sono stati 248 di cui 227 hanno dato esito negativo e 21 hanno dato esito positivo; la positività è risultata essere pari al 8,47% (IC95% 5,00%-11,93%). Degli stessi animali sono stati testati i sieri, 230 sono risultati negativi e 18 positivi, positività pari al 7,26% (IC95% 4,03%-10,49%) (Fig.1).

I 3 campioni risultati positivi al test su cute auricolare ma negativi al test su siero sono stati ritestati in seguito, l'esito del test su siero è risultato sempre negativo.
L'indice K è risultato pari a 0,917 (IC95% 0,793-1,041).
Tutti gli accertamenti effettuati sui campioni di milza, siero e cute auricolare per la ricerca dell'antigene dei 6 capi PI hanno dato esito positivo, con l'eccezione di un campione di milza risultato negativo alla test ELISA-AgNS3 (Tab.1).

Fig.1: Confronto ELISA Ag E^{rns} su siero e cute auricolare



Le indagini sierologiche per il rilevamento di anticorpi anti-BVDV hanno dato esito sempre negativo.
Le prove di amplificazione del genoma virale tramite RT-PCR sono risultate positive in tutti e sei i campioni (Tab.1).
Le prove di ripetibilità e riproducibilità hanno dato esiti sovrapponibili (K=1,000; IC95% 0,659-1,341).

DISCUSSIONE

L'applicazione del test ELISA-AgE^{rns} su frammenti di cute auricolare e su sieri di animali di età compresa tra 0 e 3 mesi ha dato esiti lievemente discordanti. Si è riscontrata una maggior sensibilità del test utilizzando come matrice la cute auricolare.
I tre capi risultati negativi al test su siero e positivi al test su cute auricolare sono poi stati identificati come capi PI. La ricerca di anticorpi anti-BVDV nel siero di questi animali ha dato esito positivo al primo controllo ma negativo al secondo test, confermando la presenza dell'effetto blanketing imputabile agli anticorpi colostrali.
L'insieme dei test applicati sui campioni dei sei animali PI di riferimento hanno dato esiti coerenti.
Le prove di ripetibilità e riproducibilità del metodo, eseguite da due operatori differenti, hanno mostrato un elevato grado di accordo evidenziando la perfetta applicabilità del test in laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Edmondson M.A., Givens M.D., Walz P.H., Gard J.A., Stringfellow D.A., Carson R.L. (2007) "Comparison of tests for detection of bovine viral diarrhea virus in diagnostic samples" J. Vet. Diagn. Invest. Jul19(4): 376-81;
2. Knipe D.M., Howley P.M. (2007) Fields virology, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 33: 1126-1131;
3. Kuhne S., Schroeder C., Holmquist G., Wolf G., Horner S., Brem G., Ballagi A. (2005) "Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus infected cattle testing tissue samples derived from ear tagging using an E^{rns} capture ELISA" J. Vet. Med. B 52: 272-277;
4. Sandvik T. (2005) "Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes" Preventive Veterinary Medicine 72: 3–16.

Tab.1: Prove diagnostiche eseguite su campioni di capi PI (/ = prova non eseguita)

CAPO PI	ELISA Ag Erns I prova	ELISA Ag Erns II prova	ELISA Ag Erns III prova	ELISA Ac P80 I prova	ELISA Ac P80 II prova	ELISA Ac P80 III prova	ELISA Ag Erns CUTE	ISOLAMENTO da MILZA	ELISA Ag MILZA	RT-PCR CUTE
1	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
2	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS
3	POS	POS	/	NEG	/	/	POS	POS	POS	POS
4	POS	POS	/	NEG	/	/	POS	POS	POS	POS
5	POS	POS	/	NEG	/	/	POS	POS	POS	POS
6	POS	POS	/	NEG	/	/	POS	POS	NEG	POS

PRESENZA DI METALLI PESANTI IN TARTARUGHE COMUNI (*Caretta caretta*) SPIAGGIATE LUNGO LE COSTE PUGLIESI

Prearo M.[1], Squadrone S.[1], Tarasco R.[1], Zizzo N.[2], Appino S.[3], Pavoletti E.[1], Abete M.C.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; [2] Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Strada Provinciale per Casamassima, Km 3 - 70010 Valenzano (Bari); [3] Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria,Via Vienna 2 - 07100 Sassari.

Key words: *Caretta caretta*, Metalli pesanti, Costa pugliese

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni, gli animali selvatici marini stanno assumendo una importanza sempre più rilevante nella valutazione dello stato di salute dell'ambiente poiché, a causa del bioaccumulo, nelle specie all'apice della catena alimentare, si riscontrano alte concentrazioni di composti tossici, tra i quali i metalli pesanti. Per questo motivo il monitoraggio ambientale, nonostante sia condizionato da diversi fattori, può fornire dati estremamente utili sul grado di inquinamento di una determinata area (3).

La tartaruga comune (*Caretta caretta* L. 1758) è la specie più numerosa del Mediterraneo. E' un rettile che da adulto raggiunge la lunghezza di 80-140 cm ed un peso di 80-150 kg. Il carapace presenta una colorazione rosso mattone uniforme, striato di scuro nei giovani esemplari ed un piastrone giallastro. Sono animali a dieta prevalentemente carnivora, nutrendosi per la maggior parte di molluschi, crostacei, echinodermi, pesci e meduse (2; 6).

La sopravvivenza di questi rettili marini è fortemente minacciata dalle attività antropiche: i rifiuti, gli ami da pesca e i motori dei natanti sono le principali cause di mortalità. Anche l'inquinamento da metalli pesanti o da altri composti tossici, inorganici od organici, può essere causa del decremento del numero dei soggetti nell'areale del mediterraneo (7).

Scopo del presente lavoro è di valutare il livello di contaminazione da cadmio, mercurio e piombo in soggetti adulti di *Caretta caretta* trovati spiaggiati lungo le coste della Regione Puglia.

MATERIALI E METODI

Durante il primo semestre 2008, sono stati ritrovati 11 esemplari di *Caretta caretta* lungo le coste della regione Puglia. Tutti gli esemplari sono stati trasportati presso le strutture della Facoltà di Medicina Veterinaria di Valenzano (BA) e sottoposti ad indagine autoptica. Da ogni esemplare sono stati prelevati campioni di organi (fegato, rene e polmone) e di muscolo da inviare all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino per le analisi chimiche; tutti gli organi, debitamente contrassegnati, sono stati congelati fino all'esecuzione delle analisi previste.

La determinazione analitica di cadmio e piombo è stata effettuata mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica. Ogni campione (2 g) è stato omogeneizzato e mineralizzato in forno a microonde ad alta pressione, in presenza di una miscela di acido nitrico (7 ml) e perossido di idrogeno (1,5 ml) (4; 5).

La ricerca del mercurio invece è stata effettuata mediante analizzatore diretto del mercurio DMA-80 (TDA-AAS - Thermal decomposition amalgamation and Atomic absorbtion spectrophotometry) su un campione di circa 0,15 g di peso. Le concentrazioni di mercurio sono state ricavate confrontando le curve ottenute dai campioni esaminati con quelle determinate da soluzioni standard.

Il limite di quantificazione (LOQ) è 0,100 mg/Kg, con una incertezza di misura del metodo parti a 4,5%.

RISULTATI

Gli organi più contaminati sono stati fegato e rene.

Nel fegato tutti i soggetti hanno presentato livelli di cadmio al di sopra del limite di quantificazione del metodo; la media è risultata di 0,27 ppm (DS = 0,24) con un livello massimo di contaminazione di 0,76 ppm nel soggetto 10. Per quanto riguarda il livello di contaminazione del mercurio, 5 soggetti hanno presentato livelli di contaminazione al di sotto dell'LOQ (<0,10 ppm); la media è risultata pari a 0,20 ppm (DS = 0,255) con un livello massimo di 0,910 ppm nel soggetto 1. Per il piombo la media è risultata pari a 0,05 ppm (DS = 0,046), con un livello massimo di 0,15 ppm nel soggetto 4; inoltre 7 soggetti su 11 hanno presentato un livello inferiore all'LOQ del metodo (<0,04 ppm) (Tabella 1).

Tabella 1 – Livelli di Cd, Hg e Pb in fegato (mg/kg).

	Cadmio	Mercurio	Piombo
1	0,10	0,910	<0,04
2	0,04	<0,10	<0,04
3	0,03	<0,10	0,08
4	0,07	<0,10	0,15
5	0,13	0,299	0,10
6	0,51	0,250	<0,04
7	0,35	0,102	0,09
8	0,51	<0,10	<0,04
9	0,28	0,264	<0,04
10	0,76	0,125	<0,04
11	0,15	<0,10	<0,04
Media	0,27	0,200	0,05
D.St.	0,24	0,255	0,046

Nel rene sono stati riscontrati livelli di contaminazione simili a quelli del fegato. Il cadmio presenta una media di 0,916 ppm (DS = 1,191) con un valore massimo di 4,28 ppm nel soggetto 2.

In 8 soggetti i tenori dl mercurio sono risultati inferiori al limite di quantificazione del metodo, infatti, la media è stata di 0,110 ppm (DS = 0,137) con un tenore massimo di 0,50 ppm.

Il piombo ha presentato una media di 0,06 ppm (DS = 0,074) con un tenore massimo di 0,25 ppm nel soggetto 3. Anche in questo caso 7 campioni su 11 analizzati avevano un livello inferiore al limite di quantificazione (Tabella 2).

Nel polmone i livelli di contaminazione sono risultati minori rispetto agli altri due organi.

Il tenore medio di cadmio è stato di 0,17 ppm (DS = 0,105) con un livello massimo di 0,31 ppm nel soggetto 3. Per quanto riguarda mercurio e piombo 10 organi su 11 presentavano tenori inferiori ai limiti di quantificazione (Tabella 3).

Tabella 2 – Livelli di Cd, Hg e Pb in rene (mg/kg).

	Cadmio	Mercurio	Piombo
1	1,41	0,50	0,08
2	4,28	<0,10	<0,04
3	0,04	<0,10	0,25
4	0,91	<0,10	0,06
5	0,15	0,185	0,14
6	0,49	<0,10	<0,04
7	<0,01	<0,10	<0,04
8	0,51	<0,10	<0,04
9	0,86	0,125	<0,04
10	0,67	<0,10	<0,04
11	0,75	<0,10	<0,04
Media	0,916	0,110	0,06
D.St.	1,191	0,137	0,074

Tabella 3 – Livelli di Cd, Hg e Pb in polmone (mg/kg).

	Cadmio	Mercurio	Piombo
1	0,02	0,25	<0,04
2	0,24	<0,10	<0,04
3	0,31	<0,10	<0,04
4	0,22	<0,10	0,05
5	0,20	<0,10	<0,04
6	0,09	<0,10	<0,04
7	<0,01	<0,10	<0,04
8	0,28	<0,10	<0,04
9	0,08	<0,10	<0,04
10	0,18	<0,10	<0,04
11	0,25	<0,10	<0,04
Media	0,17	---	---
D.St.	0,105	---	---

Infine, nel muscolo i livelli dei metalli pesanti ricercati sono risultati decisamente inferiori rispetto agli altri organi.
Per il cadmio, si è potuto osservare un valore medio di 0,03 ppm (DS = 0,022) con un tenore massimo di 0,08 ppm nell'undicesimo soggetto.
Tutti i muscoli analizzati hanno presentato valori inferiori al limite di quantificazione per mercurio e piombo (Tabella 4).

Tabella 4 – Livelli di Cd, Hg e Pb in muscolo (mg/kg).

	Cadmio	Mercurio	Piombo
1	0,02	<0,10	<0,04
2	0,02	<0,10	<0,04
3	<0,01	<0,10	<0,04
4	0,03	<0,10	<0,04
5	0,01	<0,10	<0,04
6	0,03	<0,10	<0,04
7	0,03	<0,10	<0,04
8	0,05	<0,10	<0,04
9	0,01	<0,10	<0,04
10	0,05	<0,10	<0,04
11	0,08	<0,10	<0,04
Media	0,03	---	---
D.St.	0,022	---	---

DISCUSSIONE

Dai dati ottenuti si evince che la concentrazione dei metalli pesanti oggetto di studio è maggiore in fegato e rene rispetto a polmone e muscolo; tali dati sono analoghi a quanto riportato in letteratura (7).
Questi risultati confermano comunque che le tartarughe marine, essendo al vertice della catena alimentare, presentano tenori elevati di tali elementi per il fenomeno di bioaccumulo e che possono fungere da ottimi bioindicatori per la valutazione della contaminazione ambientale.

BIBLIOGRAFIA

(1) Clarkson T.W. (1986). Mercury. *In W. Mertz ed., "Trace elements in human and animal nutrition – fifth edition, vol. 1*: 417-428.

(2) Groombridge B. (1990). Marine turtle in the Mediterranean: distribution, population status, conservation. *A report to the Council of Europe Environment Conservation and Management, Division 48. Strasbourg*.

(3) Guberti V. (1995). Animali domestici, sinantropici e selvatici come indicatori ambientali. *In "VI corso di Medicina Veterinaria ed Inquinamento Ambientale", Istituto Superiore di Sanità, Roma, 18-22 settembre 1995*.

(4) Kostial K. (1986). Cadmium. *In W. Mertz ed., "Trace elements in human and animal nutrition – fifth edition, vol. 2*: 319-345.

(5) Quarterman J. (1986). Lead. *In W. Mertz ed., "Trace elements in human and animal nutrition – fifth edition, vol. 2*: 281-317.

(6) Zucca P., Francese M., Zuppa F., Spoto M. & Oberosler R. (2003). Interventi medico veterinari su tartarughe marine comuni piaggiate nel Nord Adriatico. *J. Mt. Ecol.,* 7 (Suppl.): 279-282.

(7) Zucchini M. (2006). Valutazione degli effetti di alcuni inquinanti su diverse specie non convenzionali con particolare attenzione alle tartarughe marine (*Caretta caretta*). *Dottorato tesi, Università degli Studi di Napoli Federico II, Facoltà di Medicina Veterinaria*: 347 pp.

SUMMARY

Aim of this investigation is to evaluate cadmium, mercury and lead levels in grown-up turtles (*Caretta caretta*), found along Puglia region shores. Cadmium contamination levels turned out to be higher in liver and kidney, while the highest contents of mercury were found in liver. Muscles examination didn't result in alarming metals levels.
These data could be important from the point of view of an environmental monitoring; so heavy metals contamination doesn't appear to be worrying.

ELETTROCHEMIOTERAPIA ASSOCIATA ALL'USO DI BLEOMICINA IN UN TUMORE CUTANEO DI UN CANE: DATI PRELIMINARI.

Puleio R.[1], Cassata G.[1] , Sardisco F.[2], Tamburello A.[1], Schiavo M.R.[1], Loria G.R.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia,Veterinario Libero Professionista[2]
Key words: Electrochemotherapy, Skin tumors, Bleomycin.

SUMMARY
Electrochemotherapy (ECT) is a anticancer therapy presently standardized for treatment of skin and subcutaneous tumors (4). ECT is based on the use of non-permeant drugs possessing high intrinsic cytotoxicity (such as Bleomycin). ECT associates the administration of anti-tumor agent to local application of short and intense electric pulses that transiently permeabilize neoplastic cells. The increased uptake of chemotherapy leads to death of the neoplastic cells thus resulting in potential local control and increased survival time. We report one one case of skin cancer treated with ECT. Dog was treated with local injection of chemotherapyc drug (Bleomycin) followed five minutes later by trains of eight electric pulses. Patient responded to the treatment, with evident reduction of tumor size four weeks after treatment.

INTRODUZIONE

L'Elettrochemioterapia (ECT) può essere definita come l'applicazione locale di impulsi elettrici che rendono permeabili le cellule tumorali a farmaci chemioterapici che normalmente non lo sono e che hanno un potere citotossico (4). E' una tecnica di trattamento dei tumori cutanei e sottocutanei che può essere presa in considerazione nei casi in cui la chirurgia sia altamente demolitiva o rifiutata dal proprietario, o ancora nel caso in cui si voglia ridurre la possibilità di recidiva alla fine di un intervento chirurgico. Una delle teorie più accreditate sul meccanismo dell'elettroporazione prevede che gli impulsi elettrici permettano la creazione di pori idrofillici responsabili del trasporto intracellulare del chemioterapico (6). I farmaci solitamente utilizzati sono la Bleomicina e il Cisplatino. La prima, non riesce a diffondere attraverso la membrana cellulare a causa delle sue dimensioni e delle caratteristiche fisico-chimiche, se non legata ad una proteina di membrana (*8*). La sua penetrazione è legata, quindi alla presenza sulla superficie cellulare di proteine carrier ed alla velocità con cui tali proteine attraversano la membrana cellulare. Tale meccanismo di assorbimento ha limitato ad oggi l'uso della Bleomicina, mentre associata all'elettroporazione il farmaco diffonde molto più velocemente ed in quantità maggiore e la potenza citotossica risulta potenziata di 8.000 volte (*1*).
Diversi studi in Medicina Umana hanno provato l'efficacia dell'ECT, il principale fra questi, il progetto Esope (6) ha esaminato tale metodica su 247 pazienti affetti da varie forme di neoplasie cutanee, per le quali erano state esaurite le possibilità terapeutiche classiche (chirurgia, radioterapia e chemioterapia). Dei 1009 noduli cutanei tumorali trattati, il 74% è scomparso completamente, mentre un ulteriore 11% è regredito parzialmente .
In questo lavoro, si riporta il caso di un tumore cutaneo di un cane trattato con l'Elettrochemoterapia in associazione all'inoculazione intratumorale di Bleomicina.

MATERIALI E METODI

E' stata selezionata una neoplasia cutanea a carico della zampa posteriore destra, precedentemente sottoposta a terapia chirurgica che dopo un mese era recidivata. Dopo adeguata informazione del proprietario sui possibili rischi, è stato ottenuto il consenso; quindi si è proceduti ad uno screening completo con esami emato-chimici e radiografie del torace ed ecografia dell'addome per la stadiazione del tumore(T=2,N=0,M=0) ed alla biopsia della neoformazione con punch da 3 mm, che è stata ripetuta ad ogni trattamento con ECT.
Il campione istologico dopo processazione, inclusione e taglio, è stato colorato con Ematossilina-Eosina. La diagnosi è risultata compatibile con un Carcinoma sebaceo, costituito da cellule epiteliali che si organizzano in lobuli di varie dimensioni ed immersi in tessuto fibroso. Le cellule neoplastiche presentano vacuoli otticamente vuoti, compatibili con vacuoli lipidici. I nuclei manifestano anisocariosi,sono aumentati di volume, ipercromatici e con nucleoli prominenti (fig.1).

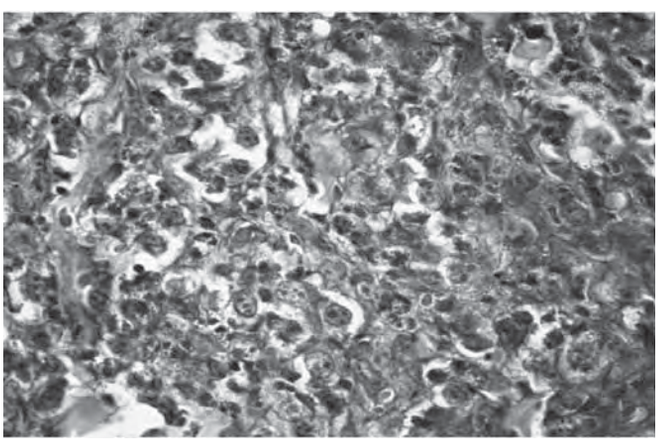


Fig. 1. Sezione istologica in Ematossilina-Eosina 63x.

Il soggetto è stato anestetizzato con Medetomidina e Ketamina e monitorato con strumento polifunzionale che rilevava saturazione periferica dell'ossigeno, dell'anidride carbonica, e tracciato ECG. Raggiunto il grado di anestesia desiderato, la neoplasia veniva misurata nei due diametri, per valutare la quantità di farmaco necessario ed infiltrata sia lungo i margini che per via intratumorale con Bleomicina (3 mg). Dopo cinque minuti, necessari alla diffusione del farmaco nella neoplasia, veniva applicata l'elettroporazione (*Cliniporator, Igea*) attraverso l'uso di un elettrodo costituito da una doppia fila di tre aghi distanti 4 mm. Tale elettrodo veniva inserito nella massa neoplastica permettendo l'invio degli impulsi elettrici (scariche di 8 impulsi della durata di 100 microsecondi, 1000 volt di ampiezza e frequenza 5 kHz). Viste le dimensioni del nodulo neoplastico (>1 cm^3), sono state effettuate diverse applicazioni con l'elettrodo (fino a 20) per coprire l'intera superficie del tumore.
La ECT è stata ripetuta dopo 14 giorni, e preceduta da una nuova biopsia per verificare l'andamento del tumore. L'efficacia del trattamento (intesa come percentuale di riduzione del tumore) ed eventuali effetti collaterali(esami ematochimici) sono stati valutati nei giorni successivi e con controlli clinici mensili.

RISULTATI

L'efficacia del trattamento è stata valutata dopo quattro settimane dall'ultima ECT, in accordo alle direttive del WHO (9) (Tab. 1):

Completa Risposta(CR)	assenza di qualsiasi traccia di tumore.
Risposta parziale (PR)	riduzione della neoplasia maggiore del 50%.
Nessun Cambiamento (NC)	riduzione del tumore inferiore al 50% ed eventuale progressione inferiore al 25%.
Progressione della Neoplasia (PD)	aumento del volume maggiore del 25%.
Risposta obiettiva (RO)	sommatoria di CR+PR

Il paziente ha avuto un miglioramento già al primo trattamento, che si evidenziava con una riduzione della dolorabilità, della zoppia ed assenza di sanguinamento della massa neoplastica; inoltre Il volume del nodulo si è ridotto del 60% , fino alla scomparsa al controllo dopo 60 gg. La completa risposta (CR) del tumore all'ECT è stata confermata dalla biopsia effettuata nell'area coinvolta dalla neoplasia, che evidenziava solo tessuto fibroblastico, associato ad aree di necrosi. Infatti le biopsie seriali ottenute prima e dopo il trattamento hanno evidenziato, come rilevato anche da altri Autori (3), che le cellule neoplastiche non subiscono le trasformazioni generalmente causate dalla somministrazione della Bleomicina, ossia aumento di volume cellulare e polinucleazione (*1*), ma marcata necrosi circoscritta al tessuto tumorale e risposta infiammatoria mediata da linfociti e plasmacellule. Come ultima valutazione bisogna aggiungere che il soggetto trattato con l'ECT non ha

sviluppato effetti collaterali/tossici dovuti al chemioterapico, fatto confermato sia da rilievi clinici che da esami ematologici.

DISCUSSIONE

L'ECT è una tecnica innovativa ed efficace che ha dimostrato una bassa tossicità e facilità di applicazione che insieme ai costi ridotti (rispetto ad altri metodi quali: chemioterapia o chirurgia) ne permettono l'uso ripetuto nel tempo ed in strutture anche ambulatoriali. In questo caso l'ECT ha permesso la remissione della neoplasia; infatti per affermare la completa guarigione sarà necessario un periodo di follow-up di almeno un anno. In conclusione l'ECT permette il trattamento delle neoplasie cutanee del cane con obiettivi miglioramenti della qualità di vita del paziente a fronte di rischi anestesiologici e tossicologici ridotti.

BIBLIOGRAFIA

1-Bleomicin is an antineoplastic agent capable of mimicking apoptosis. Tounekti O, Belehradek J Jr, Mir LM. Bull Cancer. 1994 Dec;81(12):1043-9. French

2-Electrochemotherapy with Cisplatin: the systemic antitumor effectveness of Cisplatin can be potentiated locally by the application of electric pulses in the treatment of malignant melanoma skin metastates. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D, Rudolf Z. Melanoma Res. 2000 Aug;10(4):381-5.

3-Patterns of tumor response in canine and feline cancer patients treated with electrochemotherapy:preclinical data for the standardization of this treatment in pets and humans. Spugnini EP, Baldi F, Mellone P, Feroce F, D'Avino A, Bonetto F, Vincenzi B, Citro G, Baldi A. J Transl Med. 2007 Oct 2;5:48.

4-Bases and rationale of the Electrochemotherapy. L.M. Mir .EJC supplements 4 2006 38-44

5-Electrochemotherapy: Potentiation of local antitumor effectiveness of Cisplatin in dogs and cats. Tozon N, Sersa G, Cemazar M. Anticancer Res. 2001 Jul-Aug;21(4A):2483-8.

6-Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. Michel Marty, Gregor Sersa, Jean Remi Garbay, Julie Gehl, Christopher G. Collins, Marko Snoj, Vale´rie Billard, Poul F. Geertsen, John O. Larkin, Damijan Miklavcic, Ivan Pavlovic, Snezna M. Paulin-Kosir, Maja Cemazar, Nassim Morsli, Declan M. Soden, Zvonimir Rudolf, Caroline Robert, Gerald C. O'Sullivan, Lluis M. Mir. Eur.J.Cancer 4 (2006) :3-13.

7-Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D, Rudolf Z. Clin Cancer Res 2000;6:863–7.

8-Pron G., Belehradek J., Jr, Mir L. M. Identification of a plasma membrane protein that specifically binds bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993;194:333–337

9-WHO handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva,WHO offset pubblications,1979,48, 22-27

STANDARDIZZAZIONE DI UN TEST DIAGNOSTICO IMMUNOISTOCHIMICO PER LA RICERCA DI MYCOPLASMA MYCOIDES SUBSPECIE MYCOIDES LARGE COLONY

Puleio R.[1], Tamburello A.[1], Ferrari M.[2], Schiavo M.R.[1], Nicholas R.A.J.[3], Loria G.R.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, [3] Mycoplasma Group, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge

Key words: Immunohistochemistry, Mycoplasma, Histological control

SUMMARY

Immunohistochemical assay are useful diagnostic methods for identification of bacteria on formalin fixed paraffin embedded histological sections. To validate an antii-bacterial antibody and to ensure fidelity during subsequent analyses, suitable positive and negative controls are necessary. We describe a simple method for the production of bacterial histological control samples, composed of two external layers of bovine lung parenchyma and a central layer of *Mycoplasma mycoides subspecie mycoides Large Colony.*

INTRODUZIONE

L'immunoistochimica rappresenta una tecnica di elezione nell'ambito delle diagnosi in Anatomia Patologica per individuare la localizzazione specifica di una determinato patogeno e/o struttura intra ed extra cellulare. Tale tecnica ha il pregio, rispetto ad altre indagini quali esami batteriologici o in PCR, di evidenziare la localizzazione del microrganismo nelle strutture anatomiche dell'organo interessato e nelle cellule immunocompetenti (macrofagi ecc.) permettendo uno studio istolesivo che si avvicina, per certi versi, ad uno studio patogenetico. La valenza di una reazione immunoistochimica positiva ha un peso ancora maggiore rispetto ad altri esami diagnostici, in quanto l'associazione della presenza del microrganismo alla lesione istologica ne conferma la patogenicità, soprattutto in tutti quei casi dubbi o in cui il ruolo come agente eziologico non sia stato definitivamente acclarato.

Le tecniche immunoistochimiche (IHC) sono basate sull'utilizzo di anticorpi (AB), diretti contro specifici antigeni, combinati con sistemi di rivelazione in grado di evidenziare al microscopio l'avvenuta reazione antigene-anticorpo. L'AB primario utilizzato in una IHC può essere monoclonale o policlonale: il primo solitamente è un AB commerciale con caratteristiche note indicate dal produttore (tipo di smascheramento, diluizione d'uso, tempo di incubazione); per il policlonale di cui generalmente si conosce poco, è necessario eseguire alcune prove per determinare le condizioni ottimali di utilizzo. Com'è noto gli anticorpi policlonali sono ottenuti per separazione e successiva purificazione della frazione immunoglobulinica dal siero di animali immunizzati mediante somministrazione dell'antigene (o frazione di esso); la frazione purificata è costituita dunque da una miscela di immunoglobuline dirette contro gran parte degli epitopi costituenti l'antigene inoculato. L'uso di questi anticorpi pone molti limiti legati alla specificità ed alla presenza di frazioni anticorpali a bassa intensità, da qui nasce quindi la necessità di standardizzare la metodica.

La valutazione della specificità di un anticorpo è pertanto indispensabile per una corretta interpretazione dei risultati: essa si basa sulla dimostrazione che l'anticorpo testato si lega solamente all'immunogeno impiegato per la sua produzione (Miller, 2002). In particolare, la prova di specificità è fondamentale nella valutazione di anticorpi anti-batteri di natura policlonale: essi sono prodotti per inoculazione dell'antigene in conigli che possono contenere nel loro siero anche anticorpi diretti verso batteri che frequentemente infettano tale specie animale e con cui sono venuti precedentemente a contatto (Miller, 2002). La presenza di questi anticorpi non specifici può portare ad un'errata interpretazione dei risultati di una prova immunoistochimica e dunque ad una errata diagnosi. Nella reazione IHC, al fine di valutare la specificità di un determinato anticorpo, è necessario utilizzare un tessuto di controllo contenente l'antigene noto. In questo studio gli autori descrivono la standardizzazione di una metodica IHC per la ricerca di *Mycoplasma mycoides subspecie mycoides Large Colony* mediante allestimento di un campione istologico (polmone di bovino) contenente i batteri noti, da utilizzare come tessuto di controllo positivo.

MATERIALI E METODI

Nell'ambito di un focolaio in un allevamento caprino di una forma setticemica con andamento acuto della malattia con elevata mortalità (circa 100 soggetti), in cui il riscontro clinico più evidente era una poliartrite, sono state avviate una serie di approfondimenti diagnostici (batteriologici e PCR) che hanno evidenziato una infezione da *Mycoplasma mycoides subspecie mycoides Large Colony*. Le metodiche utilizzate non permettevano però di osservare un profilo istolesivo completo (sezioni di tessuto in Ematossilina –Eosina). Gli autori hanno messo a punto e standardizzato un metodo immunoistochimico per l'evidenza del *Mycoplasma myc. sub. myc. LC*. A tal fine è stata utilizzata una metodica già sperimentata da altri Autori (Recordati et all. 2008) che prevede la "costruzione" in laboratorio di un tessuto di controllo positivo: il cosiddetto Sandwich (tessuto-coltura batterica-tessuto).

La coltura batterica pura di Mycoplasmi utilizzata per la preparazione del sandwich, è stata ottenuta da tamponi articolari prelevata da soggetti provenienti dal focolaio prima indicato, dopo passaggio in brodo (Mycoplasma broth base con siero porcino e supplemento contenente Penicillina e Tallio acetato -OXOID) L' incubazione è stata effettuata in presenza di anidride carbonica (10%) alla temperatura di 37°C (Nicholas, 2008).

Il tessuto è stato ottenuto da un polmone bovino prelevato al macello nelle 24 ore precedenti (sezioni di circa 2 x 3 cm, spessore di circa 0.5 cm). Su una sezione di tessuto è stata spalmata la coltura di batteri utilizzando un'ansa da batteriologia sterilizzata, successivamente un'altra sezione è stata poggiata sulla precedente; quindi le due sezioni sono state unite ed il bordo esterno è stato suturato con filo da sutura (seta 2/0 montato su ago triangolare traumatico), utilizzando un tipo di sutura chirurgica continua che permette una maggior tenuta. Il sandwich risultante è composto dunque da due strati esterni di polmone di bovino e da uno strato centrale di batteri. I "sandwich" così ottenuti sono stati posti in biocassette e fissati in formalina tamponata al 10% per 24-48 ore. Dopo processazione, il campione è stato rifilato per eliminare il margine esterno contenente i punti di sutura; sono state eseguite sezioni seriali trasversali di circa 4,0 mm di spessore, successivamente incluse in paraffina. Infine il campione così ottenuto è stato tagliato al microtomo (2.5-3,0 µm) e alcune sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina. Altre sezioni sono state utilizzate per la reazione IHC (disidratate attraverso passaggi seriali in alcool e successiva reidratazione) ricoperte con una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo che ha la funzione di determinare il blocco delle perossidasi endogene. Lo

smascheramento antigenico delle sezioni così ottenute è stato effettuato in tampone citrato pH 6, utilizzando un bagno termostatico a temperatura di circa 96° C per 40 minuti.
L'AB policlonale di coniglio anti- *Mycoplasma myc. sub. myc. LC* è stato fornito dal VLA di Weybridge, ove viene utilizzato per delle prove di laboratorio di inibizione della crescita dei Mycoplasmi. L'anticorpo primario liofilizzato è stato prima solubilizzato con 1,0 ml di PBS (soluzione salina fosfato tamponata) *e* quindi diluito in base dieci (1:50, 1:500, 1:5000, 1:50000), non conoscendo la diluizione ottimale d'uso (definita come diluizione con la quale si ha la massima intensità del segnale positivo, in presenza del minimo segnale di fondo). Le sezioni coniugate con le differenti diluizioni dell'AB primario, sono state incubate a temperatura di +4°C per l'intera notte. Come controllo negativo è stata utilizzata una sezione in cui l'uso dell'AB primario è stato sostituito con PBS.
Le prove immunoistochimiche sono state eseguite mediante il sistema di rivelazione avidina-biotina-perossidasi (LSAB Dako), utilizzando come cromogeno la DAB (diaminobenzidina tetraidrocloruro, Dako).
In totale sono stati preparati 10 controlli positivi e per ciascuno sono state utilizzate le 4 diverse diluizioni dell'AB primario.

RISULTATI E DISCUSSIONE
I vetrini ottenuti evidenziavano già macroscopicamente una positività di reazione che diminuiva con l'aumentare della diluizione dell'AB (Fig. 1), fino ad osservare una sola linea centrale di colorazione del sandwich ottenuto (1:5.000), che tende a scomparire per la diluizione più alta (1:50.000). Tutti i campioni esaminati (10 controlli positivi) hanno dato risultati analoghi. Al contrario il controllo negativo della reazione non mostrava alcuna colorazione.

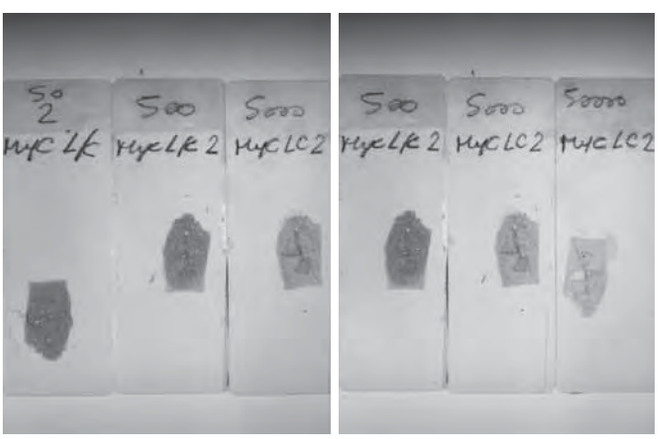


Figura 1 *Confronto macroscopico delle sezioni del tessuto di controllo positivo con le diverse diluizioni di AB primario.*

Si è scelto di osservare al microscopio le sezioni di tessuto con la diluizione dell'AB 1:5.000 e 1:50.000: anche a forte ingrandimento si evidenzia uno strato centrale di positività delimitato da due strati esterni di polmone negativo, mentre nelle diluizioni più basse (1:50, 1:500) la colorazione di fondo aspecifica risultava essere troppo marcata (Fig. 2). I risultati ottenuti dimostrano che la diluizione dell'anticorpo primario ottimale è 1:5.000, in cui si ha un buon compromesso tra la positività di reazione ed una presenza minima di fondo aspecifico. In alcuni campioni il sandwich tendeva centralmente ad aprirsi pur conservando al suo interno la colorazione positiva della reazione immunoistochimica. I campioni ritenuti idonei verranno utilizzati come tessuto di controllo positivo per gli studi istolesivi in casi accertati di *Mycoplasma myc. subsp. myc. LC.*

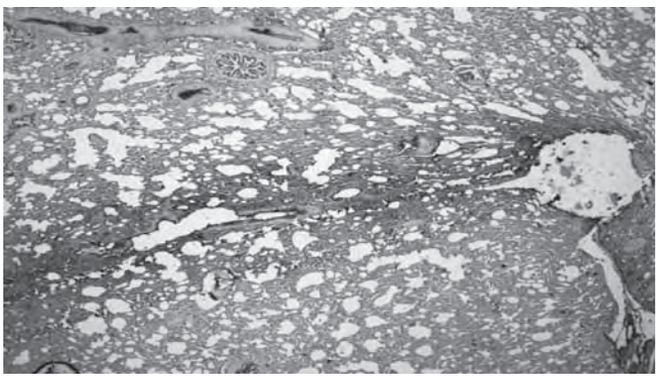


Figura 2 *Tessuto di controllo positivo: la reazione è stata ottenuta con diluizione AB primario 1:5.000 (20 x)*

La metodica utilizzata per la costruzione di tessuti di controllo positivi è risultata di facile applicazione ed ha permesso in maniera rapida ed efficace di giungere all'obiettivo prefissato, assicurando la rilevazione della specie batterica nota in un campione istologico fissato e processato secondo le stesse modalità dei campioni diagnostici. Il substrato scelto (polmone bovino) ha conservato in modo efficiente (dopo processazione, inclusione e taglio) la distribuzione della coltura batterica all'interno del sandwich nei punti prefissati, permettendone anche un ottimo assorbimento grazie alle sue doti fisiche di elasticità e permeabilità. Precedenti nostri esperimenti con altri tipi di tessuto (Fegato e Rene) non hanno dato risultati altrettanto ottimali.
Nella messa a punto di una metodica IHC con anticorpo policlonale anti-batterico è quindi di fondamentale importanza disporre di adeguati controlli positivi per definire la corretta diluizione dell'AB e per verificarne la specificità. Tale approccio può consentire (in caso di infezioni poco note o di cui non si dispone di materiale di riferimento/controlli positivi) uno studio istolesivo completo che permette di analizzare in maniera più specifica il danno anatomo-patologico.

BIBLIOGRAFIA
1) Scanziani E., 1998. Immunohistochemical staining of fixed tissue. In: Miles R., Nicholas R. Mycoplasma protocols. Humana Press, Totowa, NJ,pp.133-140.
2) Recordati C.,Radaelli E.,Simpson K.W., Scanziani E. 2008. A simple method for the production of bacterial controls for immunistochemistry and fluorescent in situ hybridation. J. Mol. Hist. 39:459-462.
3) Miller K. 2002. Immunocytochemical techniques. In: Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. Fifth edition. Churchill Livingston (Elsevier). pp 421-464.
4) Ward JM. 2004. Controls for immunohistochemistry: is "brown good enough?". Toxicol. Pathol. 32:273-274.
5)Muzzi P., Bologna M. 1999. Tecniche di immunoistochimica. Caleidoscopio italiano .
6) Daniel S., Zanin 1997. Manuale di tecnica cito-istologica. DSE Bologna.
7) Nichoals R., Ayling R., McAuliffe L. Mycoplasma Diseases of Ruminants. CABI Ed. 2008. pp. 3-14

VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA DI ALCUNI DISINFETTANTI USATI IN ACQUACOLTURA MEDIANTE L'UTILIZZO DEL SAGGIO BIOLOGICO CON *VIBRIO FISCHERI*

Righetti M.[1], Abete M.C.[1], Arsieni P.[1], Ultre M.[2], Pavoletti E.[1], Saragaglia C.[1], Squadrone S.[1], Cardente R.[2], Prearo M.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;
[2] Ecotox LDS Srl, Via Roma 47/49 – 20010 Pregnana Milanese (MI).

Key words: Disinfettanti, Acquacoltura, *Vibrio fischeri*

INTRODUZIONE

Nelle pratiche d'acquacoltura sono fondamentali i controlli e gli interventi preventivi per contrastare lo sviluppo della flora microbica patogena e/o opportunista che è alla base di numerosi problemi sanitari dei pesci allevati. Oltre alle buone pratiche d'allevamento è importante effettuare interventi di disinfezione delle attrezzature, delle strutture o superfici che vengono a contatto con l'acqua di allevamento e/o il pesce (3). L'impiego di sostanze farmacologicamente attive e di disinfettanti in acquacoltura è disciplinato da una normativa sia comunitaria (Reg. 2377/90 che definisce gli MRL) (4), sia nazionale (D. Lgs. 119/92) (1).

Al momento in Italia l'unico disinfettante registrato che può essere impiegato direttamente nell'ambiente acquatico in presenza di pesci, è il Bronopol (inserito in All. II del Reg. 2377/90 e non necessita di MRL) (4).

Scopo del presente lavoro è quello di valutare la tossicità acuta di tre sostanze disinfettanti utilizzate in acquacoltura sia dulciacquicola che marina: il cloruro di benzalconio, il Detarox e la formalina. Queste sono fra le più impiegate negli allevamenti dulciacquicoli europei e sono utilizzate solo su strumenti e strutture in cui non siano presenti organismi ittici. Infatti, è opportuno ricordare, che l'eventuale impiego anche di semplici sostanze disinfettanti su uova, avannotti o pesci adulti, deve essere equiparato ad un trattamento terapeutico e quindi tali sostanze vengono considerate come farmaci veterinari, con tutte le relative disposizioni normative (Reg. CE n. 2377/90; Reg. CE n. 726/2004) (4; 5).

I composti quaternari d'ammonio (cloruro di benzalconio, benzilammonio cloruro) svolgono attività biocida provocando la rottura della membrana cellulare e/o la denaturazione delle proteine cellulari.

Il cloruro di benzalconio è utilizzato come detergente per superfici e strumenti, in medicina umana e veterinaria. In acquacoltura è usato per la disinfezione di uova e nel trattamento contro la malattia branchiale batterica.

Con il termine di composti ossidativi, si considerano quelle sostanze dove sono presenti, da sole o in soluzione, l'acqua ossigenata (o perossido di idrogeno) e l'acido peracetico. Il meccanismo d'azione è dovuto all'ossigeno libero e al gruppo -OH che agisce ossidando il DNA e altri componenti cellulari dei microrganismi.

Il Detarox è un prodotto commerciale costituito dal perossido di idrogeno e dall'acido peracetico. Il perossido di idrogeno è largamente utilizzato nel trattamento di disinfezione delle acque reflue o industriali e degli strumenti ed attrezzi. Trova un diffuso utilizzo in medicina umana e veterinaria. In acquacoltura è adoperata contro l'infestazione da ectoparassiti (*Lepeophtheirus* sp. e *Caligus* sp.) nei salmoni. È un forte agente ossidante che induce la separazione del parassita dall'ospite. Sebbene si dissoci velocemente in ossigeno e acqua, si deve ricordare che ad alte concentrazioni (1500 mg/l) può provocare irritazioni alle branchie o effetti tossici più seri con mortalità, soprattutto in pesci adulti. Oltre all'attività antiparassitaria il perossido d'idrogeno mostra una buona attività nel controllo delle infezioni fungine durante l'incubazione delle uova. L'acido peracetico è un perossido organico; è una miscela di acido acetico (CH_3COOH), perossido d'idrogeno in una soluzione acquosa; è prodotto tramite reazione tra perossido di idrogeno ed acido acetico:

$$CH_3COOH + H_2O_2 \rightarrow CH_3COOOH + H_2O.$$

Il prodotto commerciale generalmente contiene dal 5% al 15% di acido peracetico e dal 15% al 24% di perossido di idrogeno. L'acido peracetico usato come disinfettante ossida le membrane esterne delle cellule dei microrganismi. Mostra un'azione ad ampio spettro verso batteri, virus, funghi ed ectoparassiti (*Trichodina* sp., *Ichthyobodo* sp., *Caligus* sp.). Ha una bassa tossicità nei confronti degli organismi superiori animali e vegetali; si decompone totalmente in acido acetico, ossigeno ed acqua.

La formalina è una soluzione acquosa al 37-40% di formaldeide. È utilizzata per la disinfezione delle avannotterie e delle attrezzature; ha una marcata azione su funghi (*Saprolegnia* sp.), protozoi (*Chilodonella* sp., *Ichthyobodo* sp., *Trichodina* sp.) ed altri ectoparassiti (*Gyrodactylus* sp., *Dactylogyrus* sp. ed altri monogenei). Tutte queste sostanze sono presenti in All. II. (Reg. CE n. 2377/90) ma al momento, il loro impiego, non è consentito poiché non registrate in Italia per i pesci.

La valutazione della tossicità è stata condotta mediante un saggio biologico utilizzando una specie batterica naturalmente bioluminescente, *Vibrio fischeri*. Nell'ambito del vasto panorama di saggi biologici oggi disponibili, il sistema Microtox® è considerato uno dei test più affidabili in quanto rispondente alla maggior parte dei requisiti richiesti per l'attendibilità di un test ecotossicologico quali, relativa semplicità di applicazione, standardizzazione, sensibilità, potere discriminatorio e riproducibilità. Concepito per la misura della tossicità acuta di campioni di acqua dolce, è applicabile sia su matrici liquide che solide. Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa da *Vibrio fischeri*, un batterio marino Gram negativo, aerobio-anaerobio facoltativo. In *V. fischeri* la presenza di composti tossici inibisce l'attività dell'enzima luciferasi, influendo sul metabolismo energetico e respiratorio del microrganismo (2).

MATERIALI E METODI

La luminescenza di *V. fischeri* varia di intensità proporzionalmente alla tossicità del campione. Il grado di tossicità dei campioni è valutato con un luminometro, l'analizzatore Microtox® Modello 500, mediante una prova discontinua a tempi di 5, 15, 30 minuti. L'esperimento è condotto combinando volumi specifici del campione prova o del campione diluito, con la sospensione dei batteri

luminescenti. Il risultato dell'analisi si esprime in termini di EC_X (generalmente EC_{50} o EC_{20}), cioè la concentrazione del campione che determina, dopo un tempo prestabilito, una diminuzione del 50% o del 20% della luminescenza iniziale.

Valori di EC_{50} inferiori a 1% sono riferibili a campioni estremamente tossici; per valori compresi tra 1% e 10% i campioni sono definibili

come molto tossici; valori di EC_{50} compresi tra 10% e 100% indicano la presenza di tossicità e, infine, valori di EC_{50} superiori al 100% sono ascrivibili a campioni debolmente tossici.

RISULTATI

Il cloruro di benzalconio è una miscela di sali d'ammonio quaternari. Della soluzione presente nel barattolo è stata allestita una diluizione 1:1000000 e una successiva 1:2. Sono state testate entrambi le diluizioni. I valori ottenuti sono evidenziati in tabella 1.

Tabella 1 - Valori di EC_{50} e di EC_{20} di cloruro di benzalconio.

	EC_{50} %			EC_{20} %		
	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
1:1000000	69,84	33,49	28,54	26,90	16,21	14,83
1:1000000	83,82	36,39	30,70	33,35	15,18	14,29
1:2000000	157,5	81,39	71,10	59,78	35,34	32,93
1:2000000	165,1	75,72	66,45	56,43	34,23	32,80

La soluzione commerciale di Detarox contiene il 5% di acido peracetico e il 20% di perossido di idrogeno. È stata testata una soluzione diluita 1:100000. I valori ottenuti, sono evidenziati in tabella 2.

Tabella 2 - Valori di EC_{50} e di EC_{20} di Detarox.

	EC_{50} %			EC_{20} %		
	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
1:100000	24.83	34.65	51.94	16.05	21.92	25.95
1:100000	26.43	37.61	53.11	17.20	22.64	23.78
1:100000	26.95	38.24	55.90	17.63	18.99	18.89

Della formalina è stata costituita una soluzione madre (formalina al 10%) contenente 38,42 g/l di formaldeide. Sono state allestite successivamente diluizioni scalari 1:10 fino alla concentrazione di 0,01% e successivamente diluizioni 1:2, sino ad arrivare a concentrazione di 0,00125%. I valori ottenuti sono evidenziati in tabella 3.

Tabella 3 - Valori di EC_{50} e di EC_{20} della formalina.

	EC_{50} %			EC_{20} %		
	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
0,1	3,064	2,646	1,80			
0,01	23,48	16,00	14,21	7,774	5,126	5,081
0,01	25,44	17,31	15,11	8,272	5,510	5,423
0,005	50,07	35,45	28,28	14,74	9,951	8,768
0,005	47,85	34,11	31,31	14,90	10,85	10,72
0,0025	85,91	61,56	55,13	28,50	20,29	21,76
0,0025	80,78	52,61	47,38	21,00	14,91	14,68
0,00125	194,9	181,9	114,2	47,86	33,28	36,33
0,00125	237,2	146,3	125,4	51,87	41,68	31,14

DISCUSSIONE

Come si può osservare dai risultati ottenuti le tre sostanze testate sono da considerarsi composti tossici (valori di EC_{50} compresi tra 10 e 100).
In tabella 1 il cloruro di benzalconio, alla diluizione 1:2000000 (EC_{50} a 5 minuti, con valori superiori a 100) risulta debolmente tossico; mentre dalle diluizioni di formalina analizzate (tabella 3), l'inibizione della bioluminescenza risulta molto elevata (campione molto tossico, con valori di EC_{50} compresi tra 0 e 10) alla massima diluizione testata (0,1%), diminuendo poi con le successive diluizione, fino ad arrivare alla concentrazione di 0,00125% in cui il campione risulta debolmente tossico.
Pertanto, l'uso di tale saggio biologico permette di confermare la tossicità di tali sostanze e il loro potenziale rischio.

BIBLIOGRAFIA

1. Decreto Legislativo del 27 Gennaio 1992, n. 119 (1992). Attuazione delle Direttive n. 81/851/CEE, n. 81/853/CEE, n. 87/20/CEE e n. 90/676/CEE relative ai medicinali veterinari. *G.U. n. 40 Suppl. Ord. Del 18/02/1992.*

2. Oddo, N. (2003). Significato del saggio di tossicità con *Vibrio fischeri*. *Biologi italiani* , 7: 43-47.

3. Prearo M. (2007). Igiene zootecnica: pratiche gestionali per un'acquacoltura sostenibile. *Ittiopatologia*, 4, 1: 19-40.

4. Regolamento CEE n. 2377/90 del Consiglio del 26 Giugno 1990. (1990). Definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. *G.U. L224 del 18/08/1990.*

5. Regolamento CE n. 726/04 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 31 Marzo 2004 (2004). Istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione e la sorveglianza dei medicinali per uso umano e veterinario, e che istituisce l'agenzia europea per i medicinali. *G.U. L136 del 30/04/2004.*

SUMMARY

In this investigation the acute toxicity of benzalkonium chloride, Detarox and formalin, aquaculture disinfectants, were evaluated by *Vibrio fischeri* bio-assay.
Our results showed that these three substances are toxic (EC_{50} values ranged from 10 to 100). Therefore their use and release in the environment is absolutely inadvisable.

MALATTIE DEGLI ANIMALI SELVATICI: LA RETE DI SORVEGLIANZA ITALIANA

Robetto S.[1], Palermo P.[1], Gaffuri A.[3], Gavaudan S.[4], Ferrantelli V.[5], Pasolli C.[6], Pintore A.[7], Di Ventura M.[8], Scaramozzino P.[9], Di Prisco F.[10], Ianniello M.[2], Guidetti C.[1], Navillod F.[1],& Orusa R.[1]

[1]CeRMAS - National Reference Centre for Wild Animals Diseases - Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, con annesso CeRMAS - e.mail: riccardo.orusa@izsto.it; aosta.statistica@izsto.it; cermas@izsto.it -

[2]Ministero della Salute (Roma) –

[3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna –

[4]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche –

[5] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Sicilia –

[6] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Venezie –

[7] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Sardegna –

[8]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Abruzzo Molise –

[9] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana –

[10] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Mezzogiorno.

Keywords: sorveglianza epidemiologica, focolai epidemici, WAHID

INTRODUZIONE

Ogni anno, il Centro Nazionale di Referenza per le malattie degli animali selvatici (CeRMAS) raccoglie e organizza, per conto del Ministero del lavoro, salute e politiche sociali, i dati sulla presenza di malattie degli animali selvatici registrati in ogni regione italiana.

I referenti regionali degli Istituti Zooprofilattici trasmettono la stima della situazione sanitaria del rispettivo territorio. Dall'elaborazione dei dati aggregati si delinea la situazione sanitaria italiana, la quale verrà successivamente trasmessa al gruppo di lavoro sulle malattie della fauna selvatica dell'OIE.

L'importanza di tali attività risiede nel fatto che le malattie infettive della fauna selvatica interferiscono non solo con altre popolazioni di selvatici, ma, soprattutto, con la salute degli animali domestici e delle persone. Una buona conoscenza della distribuzione delle malattie presenti sul territorio e nelle popolazioni di animali selvatici permette di agire celermente in caso di emergenza di nuovi focolai epidemici.

Il Centro Nazionale di Riferimento per le Malattie da fauna selvatica ottiene dal territorio italiano due principali tipi di dati:

per alcune patologie vi sono progetti scientifici che indagano la presenza del patogeno in una popolazione. Queste informazioni sono le più significative e possono essere utilizzate anche per controllare il tasso di prevalenza del patogeno sul territorio;

singole segnalazioni di casi positivi derivanti da un sospetto diagnostico. L'informazione che emerge da questi dati riguarda la presenza di una malattia in un territorio.

L'attività di sorveglianza epidemiologica è basata sullo studio degli spostamenti della fauna all'interno e all'esterno del territorio regionale e provinciale e sull'attivazione dei piani di controllo sanitario degli animali domestici e sulla gestione di potenziali rischi sanitari legati alla macellazione e al consumo della selvaggina cacciata.

MATERIALI E METODI

I dati richiesti dalle autorità competenti sono resi disponibili da ogni referente CeRMAS mediante compilazione di apposito documento elettronico. L'aggregazione e l'analisi dei dati è stata effettuata tramite il software STATA® e le elaborazioni ottenute sono state inoltrate dal CeRMAS ai richiedenti.

In merito ai rapporti con l'OIE, lo strumento principale utilizzato per produrre informazioni è il questionario "Annual notification of the absence of presence of Wild animal diseases" che è stato rivisitato nell'ultimo anno con specifica restituzione di dati quantitativi e qualitativi. Tramite tale strumento, il CeRMAS alimenta il World Animal Health Information Database (WAHID) attraverso il World Animal Health Information System (WAHIS).

Le informazioni trasmesse sono elaborate al fine di renderle pubblicamente disponibili per ogni nazione, di fornire dati relativi alla distribuzione, all'incidenza e alla localizzazione dei focolai epidemici di malattie degli animali, con particolare attenzione alle zoonosi.

Un'immediata rappresentazione dei dati è assicurata dalla restituzione di mappe di distribuzione disponibili per ogni patologia (WAHID).

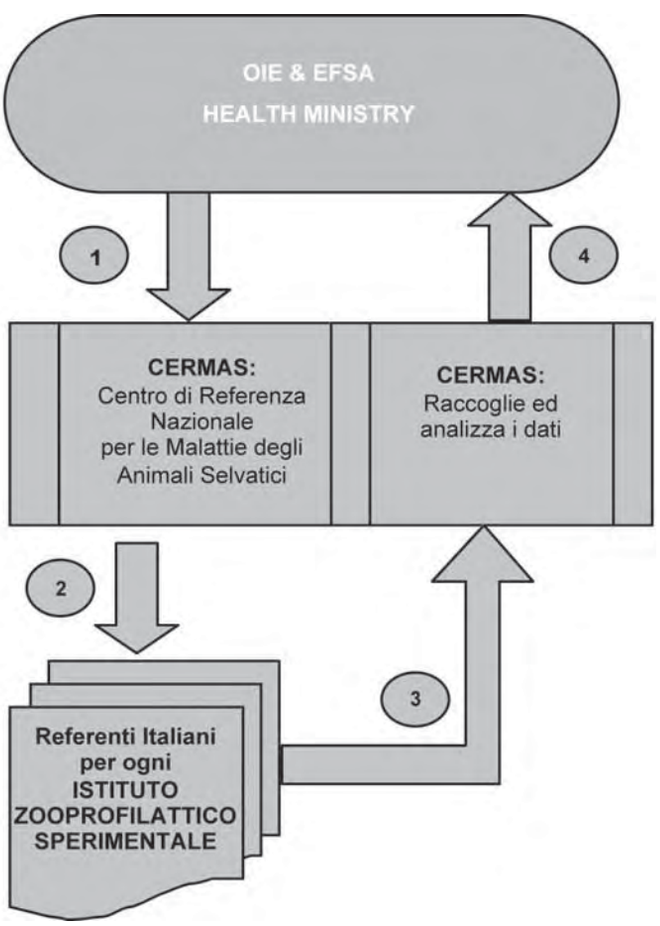


Illustrazione 1: flusso informativo CeRMAS

RISULTATI E DISCUSSIONI

18. I questionari distribuiti ai referenti CeRMAS sono stati compilati nel 90% dei casi, rappresentanti l'81% delle regioni. Di seguito si riporta la tabella riassuntiva delle malattie presenti nei selvatici sul territorio italiano.

Malattia	nr° di casi
Aujeszky's disease	650
European Brown Hare Syndrome (EBHS)	307
West Nile fever	126
Canine distemper	95
Sarcoptic Mange	85
Botulism	85
Brucellosis due to Brucella suis	67
Chemical poisons	61
Pseudotubeculosis	35
Trichinellosis	35
Salmonellosis due to S. abortusovis	28
Pestiviruses	23
Arboviruses	17
Toxoplasmosis	17
Myxomatosis	15
Leptospirosis	15

Tabella 1: Principali malattie animali selvatici 2009

La recente esperienza ha fatto emergere alcune criticità. La raccolta dati avviene in maniera differente tra i vari istituti italiani comportando l'ottenimento di dati disomogenei non espandibili all'intero territorio nazionale. Inoltre, la comunicazione è di tipo statico con scarsa interazione tra i vari referenti coinvolti. Infine, l'aggiornamento dei dati non avviene in tempo reale.

Alcune soluzioni a tali problematiche sono state intraprese, ad esempio, l'organizzazione di corsi volti ad aumentare il reciproco scambio di informazioni ed esperienze.

In futuro, si auspica la creazione di un portale che favorisca l'armonizzazione della raccolta dati e l'aggiornamento in tempo reale dello stato sanitario della fauna selvatica.

BIGLIOGRAFIA

http://www.oie.int/

SUMMARY

Every year, the National Reference Center for Wild Animals Diseases (CeRMAS) on behalf of the Ministry of Health collects and organizes data about the presence of wild animal diseases from each Italian Region. There's a referent for Wild Animal Diseases in each Istituto Zooprofilattico Sperimentale, who have to estimates sanitary situation in his territory. The meaning of this work is wildlife infectious diseases can interfere on the health of domestic animals, of humans and also damage wild range populations. It is then of great importance having a good knowledge regarding the diseases present in wild population and their effects on wildlife, on domestic animals and on men.

INDAGINI SU UNA MORIA IMPROVVISA DI *ANODONTA CYGNEA* NEL LAGO TRASIMENO (UMBRIA)

Rocchegiani E., Di Trani V., Masini L., Ottaviani D., Leoni F., Orletti R.
Centro di Referenza Nazionale per il Controllo Microbiologico e Chimico dei molluschi bivalvi vivi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione Diagnostica di Ancona

Key words: *Anadonta cygnea, sudden death, Dreissena polymorpha*

SUMMARY
In the last years various cases of sudden mortality of Anodonta (fresh water molluscs) have been described in Italian lakes and rivers. Frequent causes of anomalous death are infectious agents, toxic molecules produced by algal blooms, sudden leaks of chemicals derived from hydrocarbons or cyanides.
This work describes a preliminary survey on samples of *Anodonta cygnea* after sudden mortality of the autochthonous population of the lake Trasimeno in august 2008.
More attention should be also reserved to a new host of the Italian fresh waters: the bivalve mollusc *Dreissena polymorpha* that can modify delicate ecological equilibriums which determine the life of Anodonta in lakes and streams.

INTRODUZIONE

Nel recente passato sono stati descritti numerosi casi di improvvisa mortalità di *Anodonta spp.* (Mollusco: Bivalvia, Unionidae) in fiumi e laghi italiani.
Il problema principale è che non esistono dati sulle dinamiche di popolazione degli Anodonti, per cui non è facile interpretare quanta parte della moria sia fisiologica e quanta parte realmente anomala.
Tra le più frequenti cause di mortalità anomale di Anodonta ci sono agenti infettivi, molecole tossiche (microcistine) prodotte da fioriture algali (Gkelis *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2004; Augspurger *et al.*, 2003), sversamenti improvvisi di sostanze chimiche derivate da idrocarburi o rappresentate da cianuri (Saker et al., 2004).
Nel presente lavoro si intendono descrivere i risultati di un'indagine su campioni di *Anodonta cygnea* prelevati in seguito all' improvvisa moria della popolazione autoctona del Lago Trasimeno nell'agosto 2008.
Il lago Trasimeno ha una forma tondeggiante irregolare con sviluppo spondale di 53 km. Al suo interno sono presenti tre isole, Polvese, Maggiore e Minore.
Di origine tettonica, è un lago laminare, chiuso e poco profondo, da sempre caratterizzato da un regime idrologico irregolare e fortemente suscettibile a variazioni determinate dall'andamento pluviometrico. Le sue acque raggiungono una profondità massima che supera di poco i 6 metri.
Anadonta cygnea è il mollusco bivalve più diffuso nel Lago Trasimeno; è un grande mollusco bivalve della famiglia *Unionidae*, vive nelle acque stagnanti o lentamente fluenti con fondo melmoso in cui si infigge con parte della conchiglia. Non utilizzata dall'uomo a scopo alimentare, riesce a filtrare circa 40 litri d'acqua l'ora. La forte azione filtrante permette di mantenere l'acqua limpida. L'azione di infossamento contribuisce a mantenere il substrato ossigenato.
Nell'estate 2008 il fattore meteorologico associato alla captazione delle acque per uso agricolo ha prodotto un abbassamento del livello idrometrico a meno 160 cm, il più basso mai registrato: tra la fine di Luglio e l'inizio di Agosto si è registrata una morìa di Anodonta col riversarsi sulle rive di un tappeto di gusci vuoti ed il galleggiamento di una massiva quantità di corpi dei molluschi in stato di decomposizione a cui è attribuibile l'odore ammoniacale che emanava dalle acque. La ricerca di specie algali tossiche effettuata dall'ARPA Umbria in quel periodo ha rilevato un loro aumento esponenziale da poche decine/l ad alcuni milioni/l.
Tra di esse è stata riconosciuta la varietà *Cylindrospermopsis raciborskii* (un cianobattere che produce cilindrospermopsina e Saxitossina).

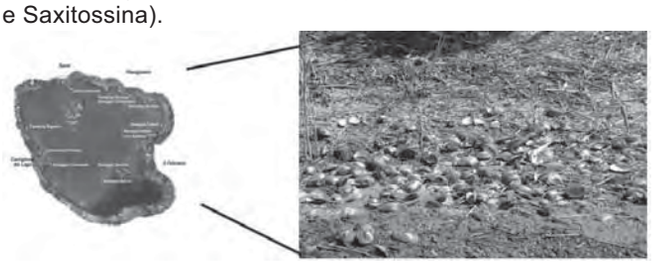


Figura 1. *Gusci di Anodonta morti nel Lago Trasimeno*

MATERIALI E METODI

Campionamento
Campioni di molluschi in stato agonico (30 soggetti emersi con valve parzialmente aperte) e campioni di acqua di superficie sono stati prelevati e successivamente trasportati in contenitori isotermici al Centro di Referenza Nazionale per il controllo microbiologico e chimico dei molluschi bivalvi vivi (CEREM) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche presso la Sezione di Ancona.
I punti di prelievo sono stati sette: Lido Comunale di Tuoro, Pontile Vecchio e Spiaggia San Francesco dell'Isola Maggiore, Spiaggia La Darsena, il Camping Europa, Spiaggia Nuova e Spiaggia Vecchia dell'Isola Polvese.

Esame macroscopico
I molluschi sono stati esaminati per l'eventuale rilevazione di alterazioni morfologiche macroscopicamente visibili (forma, volume, colore, consistenza).

Esami batteriologici
I molluschi sono stati sottoposti agli esami per la ricerca di *Salmonella spp*. ed *E. coli* rispettivamente secondo le procedure ISO 6579:2004 e ISO 1649-3:2005.
In aggiunta sono stati sottoposti agli esami per la ricerca e l'identificazione di *Aeromonas* mesofili e *Vibrio spp*.
I vibrioni sono stati isolati su TCBS agar (Oxoid Ltd.) ed identificati con il protocollo biochimico standardizzato (Ottaviani *et al*., 2003). All'isolamento di *V. cholerae* è seguita l'applicazione di tecniche biomolecolari per l'individuazione di geni per le tossine *ctx* e *tcp* e dei geni per l' enterotossina termostabile *stn/sto* (PCR qualitativa). I batteri appartenenti al genere *Aeromonas* sono stati isolati su agar amido-ampicillina e identificati a livello di fenospecie secondo un protocollo biochimico standardizzato (Ottaviani *et al*., 2006).

Esami chimici
I molluschi sono stati sottoposti agli esami per la ricerca di metalli pesanti (Pb, Hg, Cd) mediante ICP-MS, alla ricerca di IPA [5-metilcrisene, benzo(a) antracene, benzo(a) pirene, benzo(b) fluorantene, benzo(g,h,i)perilene, benzo (j) fluorantene + benzo(k) fluorantene, ciclopenta (cd) pirene, crisene, dibenzo(a,e) pirene, dibenzo(a,h) antracene,

dibenzo(a,h)pirene, dibenzo(a,i) pirene, dibenzo(a,l)pirene, indeno(1,2,3-c,d)pirene]; PCB (18 congeneri), pesticidi organoclorurati (aldrin, cis-clordano, clorpirifos, clorpirifos-metile, dicofol, dieldrin, endosulfan, endosulfan alfa, endosulfan- sulfate, endrin, eptacloro, esaclorocicloesano alfa, beta e gamma, HCB, heptachlor epoxide endo, heptachloe epoxide exo, metossicloro, o,p'-ddd, o,p'-dde, o,p'-ddt, p,p'-ddd, p,p'-dde, p,p'-ddt, procimidone, transclordano) tramite tecniche di gascromatografia-spettrometria di massa, gascromatografia ECD.

Esami biotossicologici
I molluschi sono stati analizzati per la ricerca di contaminazioni da biotossine PSP tramite saggio biologico .
Nello stesso tempo anche i campioni di acqua sono stati analizzati per la ricerca di biotossine del tipo microcistine e cilindrospermopsine tramite test ELISA specifici (Gkelis *et al.,* 2006).
Infine in un campione di retinato algale consegnato dall'ARPA Umbria nell'ambito del piano di sorveglianza dell'eutrofizzazione sono state eseguite prove per la ricerca di biotossine del tipo PSP tramite biosaggio (Nota Min n. 400.4/13.1/3/562 del 9 aprile 1998).

RISULTATI

Esame macroscopico
La larghezza delle valve variava da un minimo di 7 cm ad un massimo di 18 cm. Non sono state evidenziate alterazioni di forma, spessore, colore delle valve. All'apertura delle valve si è riscontrata un'abbondante presenza di fango. I corpi dei molluschi non presentavano in generale alterazioni visibili.

Esami batteriologici
Gli esami batteriologici hanno evidenziato assenza di *Salmonella spp*. in 25 g, una media di *E. coli* inferiore a 100 MPN/100 g, ma presenza di *Aeromonas* mesofili e *Vibrio spp*. successivamente identificati come fenospecie *A. sobriae* e *V. cholerae* non O1 non O139.
Il ceppo di *V. cholerae* isolato ha dimostrato proprietà beta-emoltiche su piastre di agar sangue al 5% di globuli rossi di montone.Le tecniche biomolecolari non hanno evidenziato la presenza dei geni *ctx/tcp* e *stn/sto.*

Esami chimici
Tra i metalli, sono stati rintracciati solo piombo e mercurio in concentrazioni inferiori ai limiti previsti dal Reg. CE 1881/2006.
Non sono stati rilevati né pesticidi organoclorurati nè IPA.
I valori di PCB si attestavano, per la maggior parte, al di sotto di 20 ng/g con 1% di grasso estratto. Per i congeneri PCB-138 e PCB-153 si sono rilevati valori massimi rispettivamente di 29 ng/g e 39 ng/g.

Esami biotossicologici
I molluschi e i retinati algali sono risultati negativi per la presenza di biotossine PSP. Anche i campioni di acqua hanno fornito esito negativo alle analisi per PSP, microcistine e cilindrospermopsine.

CONCLUSIONI
I valori si sono dimostrati conformi per i parametri biotossicologici, chimici e batteriologici.
In nessun campione di acqua sono state rintracciate biotossine potenzialmente tossiche per i molluschi, nonostante sia stato rilevato un drastico aumento del numero di specie algali tossiche o potenzialmente tossiche, tra cui *Cylindrospermopsis* spp.
Tuttavia, indagini microbiologiche approfondite hanno permesso di isolare ed identificare due specie batteriche quali *Aeromonas sobriae* e *Vibrio cholerae* non O1 non O139, ubiquitarie negli ambienti acquatici, ma patogeni opportunisti.
Una particolare attenzione andrebbe invece riservata ad un nuovo ospite delle acque dolci italiane: il mollusco bivalve *Dreissena polymorpha* che può modificare i delicati equilibri ecologici che determinano la vita degli Anodonti nei laghi e nei diversi corsi d'acqua (Bykova *et al.,* 2006).
Gli effetti dell'introduzione di questa specie alloctona sui delicati equilibri ecologici del lago Trasimeno sono ancora tutti da verificare.
Dreissena polymorpha è a tutti gli effetti una specie invasiva ed in quanto tale, la sua presenza provoca conseguenze negative alla biodiversità. Diverse ricerche confermano che la Dreissena entra in competizione per l'habitat e le risorse di cibo con gli altri molluschi autoctoni della famiglia Unionidae (in particolare del genere Unio e Anodonta) la cui densità tende a diminuire drammaticamente. Inoltre, le larve liberamente natanti (veliger) di Dreissena portano a cambiamenti composizionali nelle comunità fitoplanctoniche e zooplanctoniche. L'impatto sull'habitat causa diverse modificazioni: ad esempio, l'attività filtrante porta all'aumento della trasparenza dell'acqua, a sua volta correlato con la maggiore disponibilità di luce che favorisce l'accrescimento di piante acquatiche e alghe. Inoltre, nei casi di infestazioni gravi, l'enorme quantità di gusci vuoti che si depositano post mortem modificano la struttura dei fondali con conseguenze sulle comunità bentoniche. Oltre ai gusci, sul fondo si depositano anche le sostanze inquinanti accumulate per filtrazione, compromettendo la qualità delle acque. La Dreissena potrebbe, con il tempo, sostituire completamente molluschi autoctoni quali Anodonta, sia per competizione diretta, sia perché, distribuendosi su tutto lo spessore dell'acqua aggrappandosi a qualsiasi tipo di substrato, non risente di eventuali fenomeni di anossia del fondale (Cingolani *et al*. , 2004).

BIBLIOGRAFIA

1. Saker M. L., Metcalf J. S., Codd G. A., Vasconcelos V. *Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel Anodonta cygnea* Toxicon 43, 185–194(2004)
2. Gkelis S., Lanaras T., Sivonen K. *The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters* Aquatic Toxicology 78, 32–41(2006)
3. Pereira P., Dias E. , Franca S., Pereira E., Carolino M. *Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfishtoxins by the freshwater mussel Anodonta cygnea* Aquatic Toxicology 68, 339–350 (2004)
4. Augspurger T., Keller A. E.,Black M. C, Cope W. G., Dwyer F. J. *Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure* Environmental Toxicology and Chemistry, 22 (11), 2569–2575 (2003)
5. Bykova O., Laursen A., Bostan V. , Bautista J., McCarthy L. *Do zebra mussels (Dreissena polymorpha) alter lake water chemistry in a way that favours Microcystis growth?* Science of the Total Environment 371, 362–372 (2006)
6. Ottaviani D., Masini L., Bacchiocchi S.. *A biochemical protocol for yhe isolation and identification of current species of Vibrio in seafood.* Journal of Applied Microbiology 95, 1277-1284 (2003).
7. Ottaviani D., Santarelli S., Bacchiocchi S., Masini L., Ghittino C., Bacchiocchi I.. *Occurrence and characterization of Aeromonas spp. in mussels from the Adriatic Sea*. Food Microbiology 23, 418-422 (2006)
8. Cingolani L., Charavgis F. *Il lago Trasimeno ha un nuovo ospite.* Rivista Micron Habitat 1, 28-30 (2004)

INFEZIONE DA DIARREA VIRALE BOVINA E FATTORI DI RISCHIO IN PIEMONTE: RISULTATI PRELIMINARI

Rubinetti F.[1], **Chiavacci L.**[1], **Masoero L.**[2], **Pitti M.**[2], **Conterbia M.**[3], **Brosio A.**[4], **Beccaria D.**[5], **Franchini R.**[6], **Vitale N.**[1]

[1] *S.S. Osservatorio Epidemiologico, IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*

[2] *S.C. Laboratorio di Virologia, IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*

[3] *Asl NO - Novara*

[4] *Asl TO3 – Collegno e Pinerolo*

[5] *Asl CN1 – Mondovì*

[6] *Asl AL – Alessandria*

Key words: bovine viral diarrhoea, risk factors

SUMMARY

One hundred and two reproductive dairy herds were controlled to estimate the presence of bovine viral diarrhoea. To investigate on potential risk factors for BVD at herd level a questionnaire was administered to farmers. Data analysis related to 2007-2008 revealed a significant decrease of herd positivity. Some factors such as artificial insemination, selling calves, housing of pregnant cows, mountain pasture resulted statistical related to BVD infection. While other factors as herds size, housing system, pasture were non-significant.

INTRODUZIONE

La Diarrea Virale Bovina (BVD) è una malattia infettiva che colpisce i bovini, causando riduzione della produzione di latte, aborto, nascita di vitelli malformati, crescita ritardata.

Il virus può entrare in allevamento attraverso l'introduzione di animali infetti in modo transitorio ma soprattutto da animali persistentemente infetti (PI), soggetti che hanno contratto l'infezione per via transplacentare. Nella gestione di un piano di controllo per BVD, quindi, il principale punto su cui intervenire è l'identificazione ed eliminazione dei soggetti PI (1,2). Tuttavia risulta fondamentale prendere in considerazione e valutare anche i principali fattori di rischio di introduzione dell'infezione in allevamento quali l'acquisto di animali, la partecipazioni a mostre, il contatto con animali al pascolo, l'utilizzo di vaccini vivi, mancanza di norme di biosicurezza (2,3), le dimensioni dell'allevamento.

A livello europeo la situazione per BVD è piuttosto disomogenea . In Italia non si hanno dati a livello nazionale ed è presente un piano obbligatorio solo in Trentino Alto Adige e Friuli (3). In Regione Piemonte è partito un progetto triennale, finanziato dalla Regione stessa con la finalità di conoscere la diffusione della BVD in alcuni allevamenti bovini ad alta produzione, di mettere a punto un protocollo diagnostico ed individuare le misure sanitarie adeguate per il controllo della patologia in allevamenti ad alta produzione. Lo scopo di questo lavoro è mettere a confronto i risultati dei controlli effettuati nel due anni 2007 e 2008 e valutare la situazione sanitaria per BVD in funzione di alcuni fattori di rischio.

MATERIALI E METODI

La selezione degli allevamenti è stata effettuata sul territorio di 4 ASL piemontesi (province di NO, TO, AL, CN) in base a specifiche caratteristiche quali produzione e vendita di manze da rimonta, invio animali a centri genetici, partecipazione a fiere o mercati, adesione al piano volontario IBR. Il campionamento è stato effettuato su 102 allevamenti

Il piano di controllo prevedeva, in una prima fase, il controllo sierologico di 25 animali suddivisi in 5 categorie (0-9 mesi, 9-15 mesi, manze, primipare, pluripare) e la compilazione di una scheda epidemiologica finalizzato alla raccolta di informazioni sul management aziendale, sui fattori di rischio di introduzione dell'infezione e sullo stato vaccinale per BVD.

I sieri sono stati analizzati mediante tecnica ELISA per la ricerca di anticorpi verso la proteina NS3 (o p80). Tale metodica è la prova d'elezione per accertare la presenza di circolazione virale perché indipendente dalla variabilità genetica dei ceppi di BVD e meno disturbata dalla vaccinazione.

Gli allevamenti, in base agli esiti degli esami di laboratorio sono stati classificati in:

- all. negativi: allevamenti negativi nella fascia 9-15 mesi
- all. con circolazione virale: allevamenti con sieropositività nella fascia 9-15 mesi ma senza animali persistentemente infetti (PI)
- all. positivi: allevamenti in cui sono stati riscontrati P.I. (capi con almeno 2 esami virologici positivi a distanza di 30 giorni)

Sono stati confrontati i risultati ottenuti nel 2007 con quelli del 2008.

Le informazioni sui principali fattori di rischio sono state messe in relazione allo stato sanitario per BVD ed analizzate mediante il software SAS .

Per valutare la relazione tra stato sanitario per BVD ed caratteristiche gestionali dell'allevamento è stato calcolato il test di associazione chi quadro.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 1 sono presentati i risultati ottenuti dal confronto delle qualifiche per BVD del 2007 e 2008.

Tabella 1 Confronto qualifiche 2007 – 2008

QUALIFICHE	2008	% 2008	2007	% 2007
Aziende negative	78	78.00	75	75.00
Aziende con circolazione virale	20	20.00	15	15.00
Aziende positive	2	2.00	10	10.00
TOTALE	100	100.00	100	100.00

Il test del Chi Quadro per proporzioni conferma che le proporzioni nei due anni sono statisticamente differenti e quindi nel 2008 la diminuzione dei positivi risulta statisticamente significativa ($p>0,017$)

L'analisi dell'associazione tra fattori di rischio e situazione sanitaria per BVD è risultata statisticamente significativa per i seguenti fattori:

- Fecondazione artificiale ($chi^2=19.67$ $p<0.0001$): gli allevamenti che praticano la riproduzione artificiale hanno minori probabilità di introdurre l'infezione rispetto a quelli che praticano altri tipi di riproduzione (naturale, embryo transfer)
- Alpeggio ($chi^2=9.99$ $p<0.04$): gli allevamenti che effettuano

l'alpeggio hanno maggiori probabilità di introdurre l'infezione

- Manze/vacche gravide separate (chi^2=6.37 p<0.04): gli allevamenti che detengono le manze/vacche gravide in locali separati rispetto alle altre categorie di animali hanno minori probabilità di introdurre l'infezione
- Vendita vitelli (chi^2=9.67 p<0.04): allevamenti che vendono vitelli hanno maggiori probabilità di introdurre l'infezione.
- Episodi precedenti di Malattie delle mucose (chi^2=8.48 p<0.01): allevamenti che hanno avuto episodi di malattie delle mucose in passato è più frequente che siano positivi o con circolazione
- Precedenti diagnosi di capi PI (chi^2=26.66 p<0.0001) risultano strettamente collegate con infezione
- Acquisto ingrasso (chi^2=8.48 p<0.01): l'allevamento che acquista capi da ingrasso ha maggiori probabilità di introdurre l'infezione

Fattori che non sono risultati significativi al test Chi quadro sono

- Fornitori di maschi per centri genetici
- Vendita di capi da riproduzione
- Vendita di materiale genetico
- Orientamento produttivo (carne, latte, misto)
- Razza
- Stabulazione prevalente dei capi e stabulazione in locali comuni o differenti per le vacche, manze e vitelli
- Utilizzo di un locale sala parto
- Controlli per BVD sugli animali acquistati
- Quarantena per gli animali acquistati
- La presenza di barriere (cancelli, muri…) che impediscono accesso a persone non autorizzate
- Fecondazione naturale
- Pascolo
- Utilizzo di materiale monouso da persone che entrano in contatto con gli animali
- Utilizzo di vaccini per BVD – MD in allevamento
- Dimensioni dell'allevamento
- Utilizzo di un locale di isolamento per gli animali ammalati

I risultati concordano in linea generale con i dati riscontrati in bibliografia; l'abitudine a vendere vitelli ed acquistare capi da ingrasso rappresenta uno dei più importanti fattori di rischio per BVD, legato all'ingresso di veicoli e visitatori in allevamento. La stabulazione delle manze/vacche gravide in locali separati rispetto agli altri animali si conferma come fattore protettivo nei confronti dell'infezione.
Altri fattori quali il pascolo, il tipo di stabulazione degli animali, le dimensioni dell'allevamento, ecc. non sono risultati correlati ad un maggior rischio di introduzione dell'infezione almeno non per il gruppo di allevamenti considerato, infatti lo studio ha interessato un numero limitato di aziende, selezionate non in modo casuale.
Il confronto tra i risultati ottenuti nel 2007 e 2008 indica un certo miglioramento della situazione epidemiologica della BVD, indicando la probabile adeguatezza del protocollo diagnostico utilizzato e delle misure sanitarie intraprese negli allevamenti positivi.
Nel corso 2009 sono state coinvolte nel progetto anche altre ASL piemontesi; in tal modo si potrà avere un quadro più completo della situazione della BVD in Piemonte, si potrà sperimentare il protocollo diagnostico anche su altre aziende appartenenti a differenti realtà zootecniche e si potranno valutare i fattori di rischio su un numero più elevato di aziende.

BIBLIOGRAFIA

1. Hult L., Lindberg A. (2005). Experiences from BVDV control in Sweden" Preventive Veterinary Medicine 72, 143-148
2. Lindberg A.L.E., Alenius S. (1999). "Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations" Veterinary Microbiology 64, 197-222
3. Luzzago C., Frigerio M., Liandris E., Piccinini R., Daprà A., V., Zecconi A. (2008). "A scoring system for risk assessment of the introduction and spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy herds in Northern Italy" The Veterinary Journal 177, 236-241

INATTIVAZIONE DI LARVE DI *TRICHINELLA SPIRALIS* IN SALAMI FERMENTATI

Rugna G.[1], Merialdi G.[1], Ramini M.[1], Accurso D.[1], Gelmini L.[1], Mazzini C.[2], Bacchi M.[2], Pozio E.[3]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

[2]*ALCISA S.p.A.- Bologna – Italy*

[3]*Istituto Superiore di Sanità – Roma - Italy*

Key words: Salame, *Trichinella*, Inattivazione

ABSTRACT

In order to evaluate the influence of the fermentation of Italian salami on the viability and infectivity of *Trichinella spiralis* larvae, three different salami, *salame Salamella*, *salame Milano* and *salame Gentile* were prepared and contaminated with grounded infected mouse muscle, and cured in an experimental facility according to the standard procedures of an industrial manufacturer. Samples were collected at 0, 6, 13 days after preparation, *T. spiralis* larvae were collected by digestion and their infectivity was tested in laboratory mice.

At day 6 of maturation, larvae recovered from all samples were apparently non motile, but those from *salame Milano* were still able to infect laboratory mice. At day 13 of maturation, all larvae collected from the three salami samples resulted fully inactivated.

INTRODUZIONE

I nematodi del genere *Trichinella* sono agenti eziologici della trichinellosi, una zoonosi a trasmissione alimentare che può avere conseguenze gravi nell'uomo. Il principale rischio sanitario per i consumatori è rappresentato dal consumo di carni crude o poco cotte di animali suscettibili al parassita (8). Si ritiene che la principale fonte di infestazione per l'uomo sia rappresentata dagli alimenti che provengono da suini provenienti da allevamenti familiari, soprattutto se allevati all'aperto e quindi a contatto con la fauna selvatica (6). In Europa sono presenti 4 specie di *Trichinella*: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* e *T. pseudospiralis* (4,7). Nel 2007 sono stati notificati 779 casi di trichinellosi negli Stati Membri dell'Unione Europea. Nel 28,1% dei casi confermati la specie rilevata è risultata *T. spiralis*. (5). L'Italia è caratterizzata dall'assenza di *T. spiralis* e dalla segnalazione di sporadici focolai da *T. britovi* collegati principalmente a pratiche di allevamento rurali o al consumo di carne di selvaggina. Numerose sono le azioni intraprese da vari Paesi per ridurre l'esposizione del consumatore alle larve di *Trichinella* spp., tra cui l'ispezione individuale al macello degli animali delle specie sensibili (3), l'adozione di processi post-macellazione efficaci nell'inattivazione delle larve eventualmente presenti nelle carni (2) e campagne di educazione sulle appropriate temperature di cottura degli alimenti. Sono disponibili parecchie informazioni sui processi di preparazione delle carni inattivanti le larve di *Trichinella spp.,* in particolare sulla cottura, il congelamento e l'irradiazione. Altri metodi, come la salagione, l'affumicatura e l'essiccamento, non vengono considerati altrettanto sicuri, a causa della difficoltà nel riuscire a standardizzare e monitorare i processi. In letteratura esistono poche informazioni sulla resistenza delle larve di *Trichinella* spp. nelle carni sottoposte a fermentazione. In Italia la produzione di salami fermentati rappresenta una importante attività dell'industria di trasformazione dei prodotti a base di carne suina. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'efficacia del processo di fermentazione nel devitalizzare le larve di *T. spiralis* in tre tipologie di salami prodotti secondo protocolli industriali.

MATERIALI E METODI

Prodotto

La prova è stata condotta su 3 tipologie di salami, rappresentativi di tre distinte tecnologie di produzione della salumeria italiana:

a) *salame Salamella* - grana intermedia, acidificazione lenta, stagionatura 2 settimane;

b) *salame Gentile* – grana grossa, acidificazione lenta, stagionatura 45 giorni;

c) *salame Milano* – grana fine, acidificazione rapida, stagionatura 70 giorni.

Per la produzione degli impasti sono state usate le formulazioni e le colture *starter* tipiche del processo produttivo industriale. La produzione è avvenuta presso gli impianti dell'Azienda Alcisa S.p.A. e gli impasti sono stati trasportati presso la Sezione di Bologna dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna per le successive fasi di contaminazione, insaccatura e stagionatura.

CONTAMINAZIONE

Sono state utilizzate larve incistate di T. spiralis propagate per passaggi seriali in topi CD1 femmine di 6 settimane presso l'Istituto Superiore di Sanità. I tre impasti sono stati contaminati ciascuno con il tessuto muscolare prelevato da tre carcasse di topo macinato. Prima della fase di insacco sono stati prelevati campioni in punti diversi degli impasti per la determinazione del numero di larve per grammo. **2.3 Disegno sperimentale**

I tre gruppi sperimentali sono stati preparati e stagionati seguendo strettamente i protocolli utilizzati dalla ditta Alcisa S.p.A. per quanto riguarda ricette, tempi, temperature ed umidità relativa. Per ciascun gruppo sperimentale sono stati previsti controlli a cadenza settimanale su 1 controllo negativo e 3 campioni contaminati, fino alla settimana precedente alla data di maturazione minima commerciale. Per ogni prelievo è stato determinato il profilo chimico-fisico, quello microbiologico e la determinazione dell'infettività delle larve mediante inoculo in topi CD1.

METODI DI PROVA

Le cariche parassitarie derivanti dalla contaminazione (giorno 0) sono state determinate mediante prova di digestione artificiale con agitatore magnetico. I parametri microbiologici (carica batterica, carica lattobacilli, carica di enterobatteriacee) sono stati determinati con metodiche ISO. Le determinazioni fisico-chimiche sono state eseguite seguendo procedure standard di laboratorio. Per la prova di infettività delle larve sono stati prelevati da ogni campione 100 g di materiale da 3 punti diversi. I campioni sono stati digeriti e le larve, lavate in PBS, sono state inoculate per *os* in gruppi di tre topi (100 larve/topo), previa valutazione della mobilità delle larve. I topi sono stati sacrificati 40 giorni dopo l'inoculazione, scuoiati, eviscerati e digeriti artificialmente. Le eventuali larve presenti sono state contate per poter approssimativamente stabilire il numero di larve infettanti inoculate.

RISULTATI

I risultati delle prove effettuate sono riportati sinteticamente in tabella 1.

Tabella 1. Livello di infezione riscontrato e infettività delle larve nel modello murino ai giorni 0, 6 e 13 dopo la preparazione.

		prodotto		
Giorno		*salame Salamella*	*salame Milano*	*salame Gentile*
0	N. larve/g	2,8	24	26
	Infettività *in vivo*	sì	sì	sì
6	N. larve/g	17	2	7
	Infettività *in vivo*	no	sì	no
13	N. larve/g	11	5	20
	Infettività *in vivo*	no	no	no

Le larve al giorno zero si presentavano mobili ed hanno manifestato pieno potere infettante nei topi di laboratorio. Nel corso della prima fase della stagionatura il processo di fermentazione ha presentato risultati sovrapponibili alle curve di fermentazione ottenute nei prodotti stagionati secondo i protocolli industriali, sia dal punto di vista microbiologico che chimico-fisico. In tutti e tre i gruppi sperimentali la concentrazione dei lattobacilli è passata in 13 giorni da un valore di 5,6 ± 1,0 Log (UFC/g) a valori pari 8,9 ± 0,2 Log (UFC/g). Il pH ha raggiunto al giorno 6 valori pari a 5, 4,85 e 4,8 rispettivamente nel *salame Salamella*, *Gentile* e *Milano*. I valori di Aw e le concentrazioni di NaCl rilevate sono riportate in tabella 2.

Al giorno 6 le larve estratte dai campioni di tutte le tre tipologie di salame hanno manifestato assenza di mobilità e perdita della tipica disposizione spiralata. Tuttavia la prova biologica in topo ha mostrato che alcune larve non avevano perso la capacità infettante. Quelle estratte da *salame Salamella* e *salame Gentile* hanno manifestato una infettività residua nulla mentre le larve estratte allo stesso intervallo di tempo dal *salame Milano* sono risultate in grado di infettare i topi di laboratorio, anche se il numero di larve recuperate dai topi indicano che solo un numero molto esiguo di esse aveva mantenuto l'infettività. Al giorno 13 di stagionatura la prova di vitalità residua è risultata negativa anche per il *salame Milano.*

Tabella 2. Aw e concentrazione NaCl

Giorno	*salame Salamella*		*salame Milano*		*salame Gentile*	
	NaCl %	Aw	NaCl %	Aw	NaCl %	*Aw*
0	2,03	0,968	2,11	0,969	2,35	*0,968*
6	*2,56*	*0,952*	*2,48*	*0,952*	*3,09*	*0,956*
13	-	*0,946*	*2,82*	*0,948*	-	*0,950*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati dello studio condotto sulle tre tipologie di salame evidenziano le caratteristiche inattivanti del processo di fermentazione e stagionatura nei confronti delle larve di *T. spiralis.* Nel *salame Salamella* e nel *salame Gentile* già dopo 6 giorni dalla produzione, l'inattivazione è completa. Per quanto riguarda il *salame Milano*, invece, il tempo necessario per la completa perdita di capacità infettante delle larve è risultato essere compreso fra 7 e 13 giorni. In un esperimento condotto da altri autori su un prodotto fermentato definito *salame Genova* (9), prodotto con diverse concentrazioni di NaCl, si era osservata la devitalizzazione delle larve a partire dal tredicesimo giorno di stagionatura con una concentrazione di sale del 2%, ma gli autori concludono che una concentrazione del 2,75% garantisce una maggiore efficacia nella inattivazione delle larve. Alcuni autori (1) considerano completamente sicuri i prodotti fermentati che raggiungono valori di Aw pari a 0,940. Analizzando i risultati del nostro studio,i valori di Aw nei tre gruppi sperimentali non differiscono molto. Nel *salame Milano,* al sesto giorno di stagionatura, la concentrazione di NaCl risulta più bassa rispetto al *salame Salamella* e al *salame Gentile*. E' ipotizzabile che il livello di sale osservato nel *salame Salamella* (2,56%) al 6° giorno sia prossimo alla concentrazione minima in grado di inattivare completamente le larve di *T. spiralis,* e che questa soglia sia raggiunta nel *salame Milano* tra il 7° ed il 13° giorno dalla produzione. Bisogna tenere presente inoltre che il salame Milano presenta la sezione maggiore tra le tre tipologie di salame saggiate per cui è plausibileche le larve che hanno mantenuto l'infettività fossero quelle presenti nel cuore del prodotto e che quindi hanno subito un processo di disidratazione più lento rispetto a quello a cui sono state sottoposte le larve presenti negli atri due salami. D'altro canto i processi fermentativi sono complessi ed altri fattori, oltre alla concentrazione di NaCl, potrebbero giocare un ruolo complementare in termini inattivanti.

In conclusione, i risultati forniti da questo studio indicano come i processi industriali comunemente utilizzati per la produzione di salami fermentati siano in grado di inattivare le larve di *Trichinella spiralis* in tempi nettamente inferiori rispetto a quelli di produzione e commercializzazione.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Childers A.B., Terrell R.N., Craig T.M., Kayfus T.J., Smith G.C. (1982) Effect of Sodium Chloride Concentration, Water Activity, Fermentation Method and Dryng Time on the Viability of *Trichinella spiralis* in Genoa Salami. Journal of Food Protection, Vol. 45 pp. 816-819
2. Code of Federal Regulations, 9CFR318.10, Title 9, Animals and Animal Products, V. 2 (revised January 1, 2006). Prescribed treatment of pork and products containing pork to destroy trichinae, pp. 246–256 http://frwebgate.access.gpo.gov
3. Commission Regulation (EC) No. 2075/2005 of December 2005 laying down specific rules on official controls for Trichinella in meat. Sito WEB http://eur-lex.europa.eu
4. Dupouy-Camet J. (2006) Trichinellosis: still a concern for Europe. Euro Surveilance,11(1)
5. EFSA (2009) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoones and Zoonotic Agents In The European Union in 2007. The EFSA Journal (2009) 223
6. Gottstein B., Pozio E., Nockler K. (2009) Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. Clinical Microbiology reviews, pp. 127–145
7. Pozio, E., Murrell, K.D. (2006) Systematics and epidemiology of Trichinella. Advances in Parasitology, 63: 367–439
8. Pozio E, Kapel CM, Gajadhar AA, Boireau P, Dupouy-Camet J, Gamble HR. (2006) Trichinella in pork: current knowledge on the suitability of freezing as a public health measure. Euro Surveillance,11(46)
9. Smith H.J., Messier S., Tittiger F. (1989) Destruction of Trichinella spiralis spiralis during the preparation of the "dry cured" pork products proscuitto, proscuittini and Genoa salami.
   Canadian Journal of Veterinary Research, 53: 80-83.

CONFRONTO TRA DIVERSI SISTEMI DI ALLEVAMENTO DI GALLINE OVAIOLE ATTRAVERSO LA VALUTAZIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA

Salamano G.[1], Mellia E.[1], Schiavone A.[2], Tarantola M.[2] , Gennero M.S.[1], Doglione L.[1]
[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta -Torino
[2]Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia. Università di Torino

Key words: laying hen, housing system, acute phase protein

ABSTRACT
The aim of this study was to investigate whether the exposure of laying hens to different housing systems was associated with α1 acid glycoprotein (AGP) and albumin changes over time. ISA brown commercial layers were assigned to different housing systems: battery cages, modified cages, and free range. Each group was composed of 24 hens: 14 of them were bled within each group. Blood samples were taken from the brachial vein after 15 days (T1), 2 months (T2) and 4 months (T3) upon arrival at the new accommodation. AGP and albumin concentration showed changes over time and they were affected by housing system. Acute phase proteins could be a useful tool in the assessment of laying hen welfare.

INTRODUZIONE
L'allevamento in batteria ha avuto storicamente più successo perché rappresenta la tecnica che risponde maggiormente a criteri di razionalità e intensità produttiva, riducendo al minimo i costi e consentendo un più agevole controllo dei problemi igienico-sanitari. Tale modalità di allevamento è però inadeguata sotto il profilo del benessere dell'animale: infatti una buona produzione di uova non riflette automaticamente una condizione di welfare per le galline ovaiole, impossibilitate come sono ad esprimere pressoché tutti i comportamenti tipici della specie. Il 19 luglio 1999 il Consiglio Europeo ha approvato la Direttiva 1999/74/CE che bandisce progressivamente l'allevamento delle galline in gabbie convenzionali, non più utilizzabili a partire dal 1° gennaio 2012. La pressione selettiva ha portato verso ovaiole altamente produttive, selezionate sulla base delle loro performance zootecniche in un ambiente definito. I sistemi alternativi se da un lato permettono la possibilità di esplicare i cosiddetti comportamenti di comfort (battere le ali, stirarsi, scuotere corpo e coda, arruffare e lisciarsi le penne) dall'altro presentano anche svantaggi di non poco conto, come ad esempio il manifestarsi di fenomeni di cannibalismo e plumofagia, in quanto le interazioni sociali non possono essere osservate nell'ambiente classico di selezione in gabbie individuali. Per questi motivi il cambiamento dei sistemi di allevamento imposto dalle normative sul benessere animale mette di fronte a una serie di nuove problematiche e, nonostante i vari sforzi compiuti dalla ricerca, risulta evidente come sia ancora lontana una definitiva indicazione del miglior sistema per l'allevamento delle galline ovaiole.
Recentemente alcuni studi hanno evidenziato che le proteine di fase acuta (PFA) potrebbero essere utili non solo per monitorare i processi infiammatori a fini diagnostici e prognostici, ma anche per analizzare varie condizioni non infiammatorie che fino a poco tempo fa non si pensava influenzassero la concentrazione delle PFA (5). Le PFA sono un gruppo di circa 40 proteine prodotte principalmente dal fegato, diverse dal punto di vista biochimico-funzionale, il cui pattern di riposta è specie-specifico e la cui concentrazione ematica può aumentare (PFA positive) o diminuire (PFA negative) in risposta ad un turbamento dell'omeostasi dell'organismo (3). La α1 glicoproteina acida (GPA) è una proteina di fase acuta positiva dei polli, mentre l'albumina si comporta da negativa sia nei polli che nei mammiferi (1, 3).
Obiettivo del presente lavoro è stato quello di verificare se diversi sistemi per l'allevamento di galline ovaiole sono associati a cambiamenti nel tempo della concentrazione serica della GPA e dell'albumina, valutando la possibilità dell'utilizzo di queste PFA come parametri oggettivi per la determinazione del benessere animale.

MATERIALI E METODI
Un totale di 72 galline ovaiole ISA brown dell'età di 18 settimane sono state assegnate in maniera casuale a tre diversi sistemi di allevamento: 24 galline in gabbie convenzionali (GC, 550 cm^2/gallina); 24 in gabbie arricchite (GA, 750 cm^2/gallina, un nido, posatoi, bagno di sabbia); 24 galline allevate a terra con parchetto esterno (AT, 1.2 m^2/gallina, 4 nidi/gallina, posatoi). Cibo ed acqua sono stati forniti *ad libitum* e a tutti gli animali è stato somministrato lo stesso tipo di dieta. Per ciascun gruppo 14 galline marcate individualmente sono state sottoposte a prelievo ematico, ognuna per 3 volte, a distanza di 15 giorni (T1), 2 mesi (T2) e 4 mesi (T3) dall'accasamento. La concentrazione serica della GPA (µg/ml) è stata misurata tramite un kit commerciale basato sul metodo dell'immunodiffusione radiale (Cardiotech Services, Inc.); mentre la determinazione dell'albumina (g/dl) è stata effettuata mediante un analizzatore chimico clinico automatico (Instrumentation Laboratory 300 plus). Sul sangue intero è stata effettuata la conta eritrocitaria e leucocitaria mediante camera di Neubauer modificata. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (2003). Dopo aver verificato la normalità e l'omogeneità delle varianze è stata utilizzata l'analisi della varianza per misure ripetute, considerando il tempo come fattore di variazione entro gruppi e il sistema di allevamento come fattore di variazione tra i gruppi. Il test di Tukey è stato utilizzato per evidenziare le differenze tra i gruppi e la distribuzione delle PFA è stata descritta graficamente usando i boxplot.

RISULTATI
I dati sulla conta eritrocitaria e leucocitaria non presentano variazioni statisticamente significative né nel tempo né fra i gruppi e rientrano nei normali range di riferimento della specie. Le galline allevate in GC e in GA hanno mostrato entrambe concentrazioni elevate e simili di GPA al prelievo T1 (1214 e 1160 µg/ml), mentre al prelievo T2 (322 e 371 µg/ml) e T3 (277 e 376 µg/ml) le concentrazioni di GPA sono state significativamente più basse di T1 (Fig. 1). Un trend opposto è stato rilevato nel gruppo AT: i valori di GPA al prelievo T1 (345 µg/ml) e T2 (279 µg/ml) sono statisticamente uguali, mentre al prelievo T3 (700 µg/ml) sono significativamente più alti (Fig. 1). Le concentrazioni dell'albumina tendono a diminuire nel tempo in tutti i gruppi (il valore medio più basso è stato registrato nel gruppo AT con 1.62 g/dl), ma tale decremento è significativo solo per le ovaiole in GA.

DISCUSSIONE
Recentemente alcuni studi hanno evidenziato un legame tra le PFA e gli stati di tipo non infiammatorio che inducono stress psicofisico, suggerendo che le PFA reagiscono non solo in seguito a infezioni, neoplasie, traumi o infiammazioni, ma possono reagire anche in risposta a eventi stressanti a cui sono esposti gli animali domestici durante la normale attività

di allevamento intensivo (5, 6, 7). Le galline utilizzate in questo studio erano apparentemente sane: il fatto che i loro profili ematologici fossero nella norma e l'assenza di segni clinici supportano che i cambiamenti delle concentrazioni delle PFA non fossero collegati a infezioni o malattie. Il trend della GPA delle galline allevate in GC e in GA è identico, nonostante gli arricchimenti che dovrebbero in qualche modo migliorare il benessere degli animali. Quando si avvicina il momento dell'ovodeposizione, ad esempio, l'accesso al nido è una priorità comportamentale molto importante per l'ovaiola, al punto che in quel momento preferisce avere a disposizione un nido piuttosto che del cibo (8). Nonostante la presenza del nido nelle GA per soddisfare tale priorità, nel nostro studio non sembrano esserci stati benefici per le galline. Queste sanno distinguere gli individui familiari da quelli sconosciuti e in natura vivono in gruppi sociali nei quali è stabilita una gerarchia stabile (2). Al prelievo T1 i valori registrati sono molto elevati e questo potrebbe essere dovuto al fatto che le galline sono state obbligate ad avere contatti intensi e ripetuti, in spazi molto ristretti, con le altre galline presenti nella gabbia. Probabilmente una volta formata una gerarchia stabile le conflittualità e la competizione sono diminuite e le galline hanno avuto modo di adattarsi all'ambiente per il quale sono state selezionate. Infatti i valori di GPA registrati al prelievo T2 e T3 sono nettamente più bassi di T1 e sono stabili nel tempo. Inoltre, le ISA brown allevate a terra hanno valori di GPA che, al contrario di quelle allevate in GC e in GA, aumentano nel tempo, fino a diventare il doppio di quelli registrati al prelievo T1 e il valore medio dell'albumina di questo gruppo è il più basso registrato. La selezione genetica ha avuto come risultato atteso il miglioramento dell'adattamento delle ovaiole all'ambiente di allevamento, ma ha avuto anche effetto indiretto su alcune caratteristiche comportamentali. Inoltre, le ovaiole ad alta produttività, adattate particolarmente al loro ambiente di selezione, potrebbero aver perso la flessibilità per adeguarsi a sistemi di allevamento differenti, diventando non sufficientemente adatte per vivere all'aperto, in ambienti non controllati. Il progetto di ricerca europeo Laywel (4) ha confermato l'esistenza dei problemi che riguardano il benessere delle ovaiole in gabbie convenzionali, in quanto insiti proprio in questo tipo di allevamento. Per contro, ha stabilito che i sistemi alternativi potrebbero essere in grado di offrire un benessere soddisfacente per le galline ovaiole, in quanto ulteriori miglioramenti di questi sistemi sono ancora possibili. Alla luce di ciò, risulta necessario effettuare altri studi sull'allevamento delle galline ovaiole e, in tal senso, le proteine di fase acuta potrebbero essere un utile strumento di valutazione oggettiva del grado di benessere animale.

BIBLIOGRAFIA

1. Adler K.L., Peng P.H., Peng R.K., and Klasing K.C, 2001. The kinetics of hemopexin and α1-acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens. Avian Diseases 45: 289-296.

2. Bradshaw R.H., 1991. Discrimination of group members by laying hens *Gallus domesticus*. Behavioural Processes 24: 143-151.

3. Gruys, E., Obwolo M.J., Toussaint M.J.M., 1994. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. Veterinary Bulletin 64, 1009-1018.

4. Laywel project, 2006. Welfare implications for changes in production systems for laying hens. www.laywel.eu

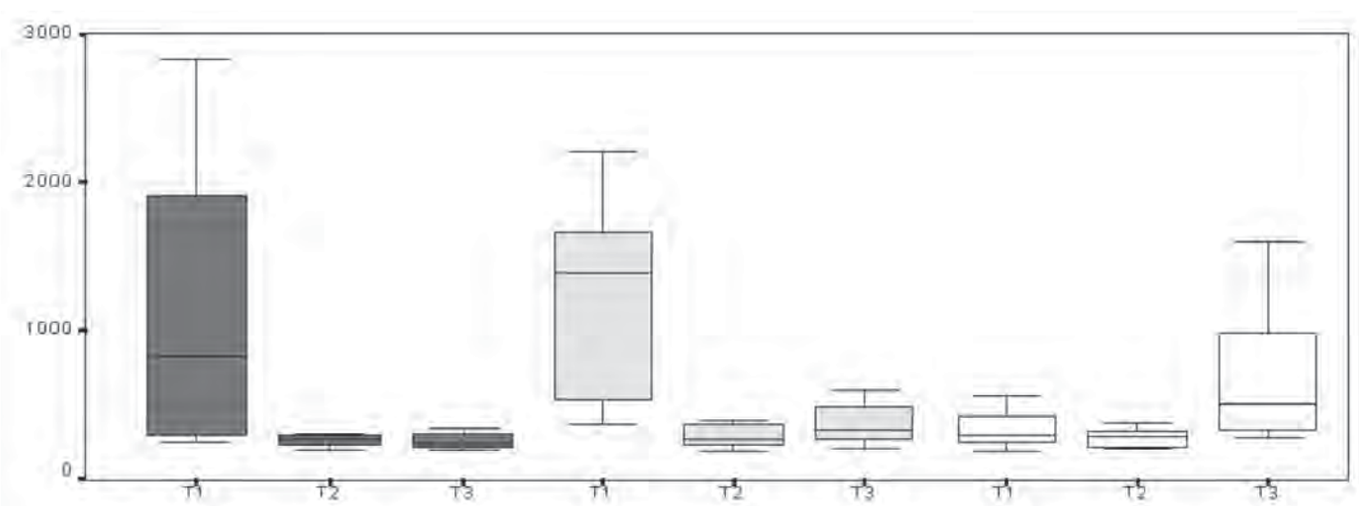
5. Murata H., 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. The Veterinary Journal 173: 473-474.

6. Piñeiro M., Piñeiro C., Carpintero R., Morales J., Campbell F.M., Eckersall P.D., Toussaint M.J., Lampreave F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. The Veterinary Journal 173(3): 669-74.

7. Salamano G., Mellia E., Candiani D., Ingravalle F., Bruno R., Ru G., Doglione L., 2008. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. The Veterinary Journal 177, 110-115.

8. Weeks C.A., Nicol C.J., 2006. Behavioural needs, priorities and preferences of laying hens. World's Poultry Science Journal 62: 296-307.

Figura 1 – Confronto delle concentrazioni di α1 glicoproteina acida (µg/ml) nel tempo e fra diversi sistemi di allevamento.



gabbie convenzionali *gabbie arricchite* *a terra*

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* IN CANI E GATTI: CONFRONTO DEI METODI DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA, AGGLUTINAZIONE DIRETTA ED ELISA INDIRETTA.

Scarpulla M.[1], Pourquier P.[2], Salvato L.[1], Macrì G.[1]
(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. 00178 Roma/Capannelle - Via Appia Nuova, 1411.
(2) ID VET Innovative Diagnostics - Montpellier, Frankreich
Parole chiave: T*oxoplasma gondii*, ELISA, agglutinazione diretta, immunofluorescenza indiretta.

SUMMARY
The performance of a modified direct agglutination test (AD) and a multispecies ELISA kit for the detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in dogs and cats sera was compared with that of the indirect immunofluorescence antibody test. Both AD and ELISA techniques showed a very good sensitivity and specificity in cat sera. In dog sera ELISA results were nearly to IFI while AD showed a low sensitivity.

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii (T. gondii) è un parassita endocellulare responsabile di una zoonosi a diffusione mondiale, in grado di infettare le specie animali a sangue caldo (5). Negli animali, come nell'uomo, l'evoluzione dell'infezione in toxoplasmosi clinica dipende dalla risposta immunitaria, dall'età, dagli organi coinvolti e dall'entità della carica infettante (5, 1). Nel cane e nel gatto l'infezione è quasi sempre asintomatica. La diagnosi *ante mortem* di toxoplasmosi si basa su una combinazione di fattori: a) rilievo di anticorpi specifici che indicano l'avvenuta esposizione a *T. gondii***;** b) l'identificazione diretta del parassita (ricerca delle oocisti nelle feci del gatto, esame istologico, PCR; c) segni clinici compatibili con toxoplasmosi ed esclusione di altre patologie con analoga sintomatologia clinica; d) risposta positiva a trattamento adeguato.
Gli anticorpi specifici si possono rilevare sia in animali infetti asintomatici che in quelli con segni di malattia non correlandosi direttamente con una toxoplasmosi clinica (1, 4).
La ricerca degli anticorpi sierici anti-*T.gondii* può essere effettuata con numerose tecniche: Dye test (DT), immunofluorescenza indiretta (IFI), test immunoenzimatico (ELISA), vari test di agglutinazione tra i quali l'agglutinazione diretta modificata (AD), Western blot (1, 8).
Il Manuale OIE definisce il Dye test (DT) test di riferimento per la ricerca di anticorpi anti-*T.gondii* ma, risultando di difficile applicabilità, in campo veterinario l'mmunofluorescenza indiretta (IFI) è utilizzata come *gold standard* nonostante tempi lunghi di esecuzione, costi elevati e risultati legati alla soggettività della lettura. Per ovviare a tali inconvenienti è bene scegliere tecniche dotate di facilità di esecuzione, economicità e oggettività della lettura (7).
Lo scopo del presente lavoro è stato quello di utilizzare le tecniche di AD ed ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*T. gondii* in sieri di cani e gatti e confrontare i risultati ottenuti con l'IFI.

MATERIALI E METODI

Campioni di siero. Sono stati esaminati i sieri di 85 cani e 110 gatti, di entrambi i sessi, di età e razze diverse, provenienti da canili di Roma e provincia o appartenenti a privati cittadini tutti inviati presso il nostro Istituto per la ricerca di anticorpi anti-*T. gondii.*
I campioni di sangue sono stati centrifugati, il siero distribuito in provette e conservato a +4°C se esaminato entro le 48 ore o congelato a – 80°C se lavorato in un momento successivo.
IFI. Sono stati utilizzati vetrini commerciali pronti all'uso (Toxoplasma gondii, Fuller-Laboratories) e anti-IgG specie-specifiche coniugate con isotiocianato di fluoresceina (SIGMA). I sieri sono stati testati alla diluizione screening di 1:20 in PBS e, se positivi, diluiti al raddoppio e titolati fino a 1:20480 (6, 3). In ogni seduta sono stati inseriti i sieri di controllo positivo e negativo ed il campione bianco. Alla lettura sono stati considerati positivi i sieri che mostravano un'intensità di fluorescenza verde brillante su tutta la superficie del tachizoita. I risultati con titolo titolo ≥ 20 sono considerati positivi e negativi quelli con titolo < 20 (7).
AD. E' stato utilizzato un test di agglutinazione modificato basato sull'impiego di tachizoiti fissati in formalina (Toxo-Screen DA, BioMerieux) (2). I sieri sono stati testati dalla diluizione di 1:20 alla diluizione di 1:20480 (3). La prova è stata eseguita in micrometodo seguendo le indicazioni riportate dal kit. Alla lettura sono stati considerati negativi i sieri che mostravano sedimentazione dei toxoplasmi a bottone o ad anello sul fondo del pozzetto (immunocomplesso assente) e positivi quelli che mostravano agglutinazione dei toxoplasmi con formazione di un velo sottile sul fondo del pozzetto (formazione dell'immunocomplesso e assenza di precipitazione dei tachizoiti). I risultati con titolo titolo ≥ 20 sono considerati positivi e negativi quelli con titolo < 20 (7).
ELISA. I campioni sono stati analizzati mediante il kit commerciale "Toxoplasmosis Indirect" (ID.VET Innovative Diagnostics), che utilizza come antigene la proteina P30 di *T.gondii***,** seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Sono considerati positivi i sieri con valore S/P ≥ 50%, negativi quelli con valore S/P ≤ 40% e dubbi quando 40% < S/P < 50%.
Analisi dei risultati. I risultati ottenuti sono stati analizzati separatamente per i cani e per i gatti. Al fine di valutare la concordanza con l'IFI delle tecniche AD ed ELISA, sono stati calcolati la sensibilità, la specificità e il Kappa (K) di Cohen.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti con le metodiche AD ed IFI nei sieri di gatto. Tutti i 42 sieri positivi in IFI si sono confermati positivi anche in AD. 67/68 sieri negativi in IFI sono risultati negativi anche in AD, il siero discordante presentava una positività in IFI alla minima diluizione testata (1:20). Nella tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti con le metodiche AD ed IFI nei sieri di cane. 40/41 sieri negativi in IFI si sono confermati negativi anche in AD, il siero discordante presentava una positività in AD alla minima diluizione testata (1:20). 31/44 sieri positivi in IFI sono risultati positivi anche in AD. Dei 13 sieri discordanti, 6 di essi presentavano positività in IFI a bassa diluizione (1:20, 1:40) e 7 a media diluizione (1:80, 1:160).

Tab. n°1
Confronto qualitativo dei risultati in AD e IFI in sieri di gatto.

	IFI+	IFI-	totale
AD+	42	0	42
AD-	1	67	68
totale	43	67	110

Legenda: (+): positivi, (-): negativi.

Tab. n° 2
Confronto qualitativo dei risultati in AD e IFI in sieri di cane.

	IFI+	IFI-	totale
AD+	31	1	32
AD-	13	40	53
totale	44	41	85

Legenda: (+): positivi, (-): negativi

Nella tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti con le metodiche ELISA ed IFI nei sieri di gatto. 42/43 sieri positivi in IFI si sono confermati positivi anche in ELISA, il siero discordante presentava una positività in IFI alla minima diluizione testata (1:20). 66/67 sieri negativi in IFI si sono confermati negativi anche in ELISA, il siero discordante presentava una positività in ELISA (S/P=55%) molto vicina al valore soglia. 42/43 sieri positivi in IFI sono risultati positivi anche in ELISA, il siero discordante presentava una positività in IFI alla minima diluizione testata (1:20). Nella tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti con le metodiche ELISA ed IFI nei sieri di cane. 40/44 sieri positivi in IFI sono risultati positivi anche in ELISA, i 4 sieri discordanti presentavano tutti una positività in IFI a diluizioni medio/basse (da 1:20 a 1:160). 39/41 sieri negativi in IFI sono risultati negativi anche in ELISA, dei 2 sieri discordanti uno è risultato dubbio in ELISA mentre l'altro presentava un valore S/P=93%.

Tab. n°3
Confronto qualitativo dei risultati in ELISA e IFI in sieri di gatto.

	IFI+	IFI-	totale
ELISA+	42	1	43
ELISA-	1	66	67
totale	43	67	110

Legenda: (+): positivi, (-): negativi.

Tab. n° 4
Confronto qualitativo dei risultati in ELISA e IFI in sieri di cane.

	IFI+	IFI-	totale
ELISA+	40	2	42
ELISA-	4	39	43
totale	44	41	85

Legenda: (+): positivi, (-): negativi

Per ciascuna tecnica e specie considerate sono stati calcolati sensibilità (Se), specificità (Sp) e kappa (K) di Cohen come stima dell'accordo tra due variabili (positivi e negativi), i valori sono riportati nelle tabelle 5 e 6.

Tab. n° 5
Calcolo di Se, Sp e K di Cohen nei sieri di gatto

	AD/IFI	ELISA/IFI
Se	98%	98%
Sp	100%	99%
K	0,99	0,98

Tab. n° 6
Calcolo di Se, Sp e K di Cohen nei sieri di cane

	AD/IFI	ELISA/IFI
Se	70%	91%
Sp	98%	95%
K	0,84	0,93

DISCUSSIONE

Tutti i valori di concordanza ottenuti, kappa (K) di Cohen, sono risultati "molto buoni" secondo la Scala di Holton.
Nel gatto sia l'AD che l'ELISA hanno mostrato, confrontati con l'IFI, valori di sensibilità e specificità vicini o uguali al 100%.
Nel cane la tecnica AD ha fornito un valore di sensibilità non elevato (70%) riportando 13 risultati falsi negativi su un totale di 44 sieri positivi in IFI. La specificità invece si attesta su valori alti. La tecnica ELISA ha mostrato invece valori di sensibilità e specificità pari al 91% e 95% rispettivamente.
Dai nostri risultati ottenuti si evince come nel gatto, oltre al test standard di IFI, si possa utilizzare per la diagnosi sierologia di toxoplasmosi sia la tecnica AD che quella ELISA avendo esse fornito risultati equivalenti.
Nel cane, la tecnica ELISA ha dato risultati molto buoni e quasi sovrapponibili a quelli dell'IFI, offrendo inoltre il vantaggio della maggiore rapidità di esecuzione e di lettura automatizzata. La tecnica AD se paragonata con l'IFI, pur mostrando una specificità molto elevata, ha invece difettato in sensibilità.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Bo S. (2005). Toxoplasmosi nel cane e nel gatto. In Manuale di malattie infettive del cane e del gatto, Ed. SCIVAC: 77-79
2. Desmonts G., Remington J. S. (1980) Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. 11(6):562-568.
3. Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MC, Kwok OC, Shen SK, Thulliez P, Lehmann T. (2004). Toxoplasma gondii infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. J Parasitol., 90(4):721-726.
4. Lappin M. R. e Turnwald G. T. (2005). Microbiologia e malattie infettive. In Willard M. D., Tvedten H.. Diagnostica di laboratorio dei piccoli animali:340-341, Ed. Elsevier.
5. Piergili Fioretti D. (2004). Problematiche e limiti dei metodi convenzionali ed innovativi nella diagnosi di Toxoplasmosi nell'uomo e negli animali. Parassitologia, 46:177-181
6. Silva D. A. O., Silva N. M., Mineo T. W. P., Pajuaba Neto A. A., Ferro E. A. W., Mineo J. R. (2002). Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* R. H. strain. Vet. Parasitol. 107:181-195.
7. Macrì G., Sala M., Linder A. M., Pettirossi N., Scarpulla M. (2009). Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. Parasitol Res. 105:35-40.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEL BOVINO DI RAZZA PODOLICA PUGLIESE: RISULTATI PRELIMINARI

SCASCIAMACCHIA S.[1], D'ANGELO F.[2], CARROZZO C. [1], GAROFOLO G.[1], LOSITO S. [1], ALBENZIO M. [2]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Unità Operativa C.P.O. - Via Manfredonia, 20 – 71100 Foggia;

[2]Università di Foggia, Dipartimento Pr.I.Me., - Via Napoli, 25 – 71100 Foggia

Key words: PODOLICA BREED, MICROSATELLITES, HETEROZYGOSITY

INTRODUZIONE

La razza Podolica origina dal *Bos Primigenius Podolicus* o *Uro*, è presente allo stato attuale nella Moldavia, nelle steppe dell'Ucraina, nella pianura ungherese e in Italia. La diffusione e la persistenza di questo bovino nelle diverse aree della nostra penisola è stata favorita dalle caratteristiche di rusticità, frugalità, dall'eccezionale potere di adattamento alle condizioni ambientali più avverse, nonché dalla straordinaria resistenza alle malattie infettive. La Podolica è una razza a triplice attitudine produttiva; a partire dal secondo dopoguerra ha subito una consistente contrazione numerica: mentre nelle regioni settentrionali furono introdotte razze bovine geneticamente più produttive, nel Sud Italia la razza Podolica fu incrociata con altre popolazioni, al fine di implementare le rese commerciali. Attualmente il sistema di allevamento del bovino Podolico è prettamente brado o semibrado ed è concentrato in Puglia, Basilicata, Calabria e Campania. La consistenza numerica dei bovini di razza Podolica iscritti al Libro Genealogico è stimata in circa 24000 animali registrati (ANABIC, 2006). Precedenti studi di caratterizzazione genetica dei bovini di razza Podolica (2, 8) hanno evidenziato un' elevata variabilità genetica della popolazione ed un difetto di eterozigosi. Si evince inoltre una stratificazione della razza in sottopopolazioni geneticamente omogenee, e identificabili nei nuclei d'allevamento. Attualmente sono in atto piani di recupero di questi bovini autoctoni con l'obiettivo di salvaguardare i genotipi locali. Lo scopo del presente lavoro e' quello di implementare le conoscenze già acquisite sulla caratterizzazione genetica di razza avvalendosi dei markers molecolari raccomandati dal panel ISAG 2003 (International Society of Animal Genetics).

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata (IZSPB) esegue l'analisi di genotipizzazione individuale nell'ambito del piano straordinario per le emergenze sanitarie. Le informazioni relative alla razza d'appartenenza sono consultabili sul sito internet dell' anagrafe bovina (*www.anagrafe.izs.it)*. Fra i campioni pervenuti per il test genetico comparativo, sono stati identificati 59 bovini di razza Podolica Pugliese, provenienti da allevamenti ubicati in provincia di Foggia (Figura 1).

Figura 1: Aree di provenienza dei campioni analizzati

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto da tessuto cutaneo secondo il protocollo previsto da DNeasy BLOOD AND TISSUE KIT (Qiagen). La determinazione della qualità e della quantità dei DNA estratti avviene mediante l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop™1000 Technologies, Wilmington DE).

PCR

Sono stati analizzati gli 11 microsatelliti noti come International Marker Set (Tabella 1). La PCR è allestita in un unica reazione nel termociclatore Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700.

Genotipizzazione

I prodotti di PCR, diluiti 1:20 in acqua deionizzata bidistillata sterile, con aggiunta di 9.25 µl di HiDi formamide e 0.25 µl di Liz 500 (Applied Biosystem) sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare sul Genetic Analyzer ABI-Prism 3130 e successivamente analizzati con il software Genemapper 4.0 (Applied Biosystem).

Analisi Statistiche

Sono stati utilizzati i seguenti software: Arlequin v3.0 (4), Genepop v4.0 (9), Cervus v3.0.3 (7) e F-Stat v2.9.3.2 (5).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In Tabella 1 vengono riportate le eterozigosità attese ed osservate per ogni marcatore. Su 11 loci analizzati, ETH10 (in grassetto nella Tabella 1) è risultato essere in disequilibrio rispetto alle proporzioni di Hardy-Weinberg (P< 0.05), con un eccesso di omozigoti. In Tabella 2 vengono riportati: il numero di alleli osservato nella popolazione, il parametro allele richness (6), il parametro Polymorphic Informative Content (PIC) (1) e le statistiche F di Wright (10) per tutti i loci esaminati. La popolazione ha presentato un elevato polimorfismo, con un numero medio di alleli pari a 9.727, confermato anche dai valori di allele richness. Il valore medio di PIC per la popolazione esaminata è risultato elevato (0.7539) e tutti i marcatori utilizzati hanno fatto rilevare valori di PIC più alti di 0.6. Nella nostra ricerca, BM2113 e TGLA122 (in grassetto nella Tabella 2) rappresentano i loci più informativi, mentre SPS115, ETH3 e BM1824 (in corsivo nella Tabella 1) sono risultati i meno informativi ed evidenziano una eterozigosità osservata inferiore agli altri loci. Dalle statistiche F di Wright sembra emergere che la varianza maggiore, all'interno della popolazione totale, potrebbe essere attribuita ad un eccesso di eterozigoti, sebbene circoscritto ad un limitato numero di loci. In generale, tale risultato sembra essere imputabile ad una frammentazione della popolazione in sotto-popolazioni, in accordo con precedenti pubblicazioni (2). Analizzando i singoli loci emergono però differenze piuttosto marcate, sia a livello di polimorfismo dei marcatori, sia negli indici di fissazione di Wright. Il livello di linkage *disequilibrium* nella popolazione è risultato essere del 22.73%, evidenziando una differenza significativa (P< 0.05) rispetto al valore atteso, ascrivibile ad accoppiamenti non casuali. In conclusione, la popolazione esaminata ha presentato una struttura genetica in equilibrio rispetto alle proporzioni di Hardy-Weinberg ed ha evidenziato una eterogeneità genetica, testimoniata dall'elevato numero di alleli dei marcatori. Le cause della eterogeneità osservata potrebbero essere imputate al fatto che in passato la razza Podolica è stata sottoposta ad incroci con altre razze allo

scopo di aumentarne la produttività. La strutturazione in sottopopolazioni sembrerebbe invece imputabile ad effetti di deriva genetica e di inbreeding, considerata la drastica contrazione numerica subita dalla popolazione e l'esiguo numero di tori.

Tabella 1 - Eterozigosità attesa e osservata per ogni marcatore nella popolazione di Podolica pugliese

Microsatellites	Chr	Locus	Range	Obs. Het.	Exp. Het.	P-value	s.d.
TGLA227	18	D18S1	81-103	0.7797	0.8295	0.5254	0.0013
BM2113	2	D2S26	123-139	0.8475	0.8447	0.5152	0.0012
TGLA53	16	D16S3	153-183	0.8246	0.8137	0.1082	0.0005
ETH10	**5**	**D5S3**	**211-223**	**0.7797**	**0.8276**	**0.0289**	**0.0005**
SPS115	*15*	*D15*	*242-256*	*0.6610*	*0.6746*	*0.1105*	*0.0006*
TGLA126	20	D20S1	114-128	0.7458	0.7765	0.0809	0.0006
TGLA122	21	D21S6	135-185	0.8980	0.8431	0.3903	0.0009
INRA23	3	D3S10	199-217	0.8103	0.8286	0.1667	0.0011
ETH3	*19*	*D19S2*	*107-129*	*0.6610*	*0.7084*	*0.3744*	*0.0014*
ETH225	9	D9S1	136-150	0.7627	0.7865	0.7415	0.0007
BM1824	*9*	*D1S34*	*176-192*	*0.6271*	*0.7333*	*0.3802*	*0.0011*
Media				**0.7634**	**0.7879**		

Tabella 2 - Numero di alleli osservato, allele richness, PIC e fattori di Wright nella popolazione di Podolica pugliese esaminata

Microsatellites	Nr. Alleles	Allele Richness	PIC	FIS	FST	FIT
TGLA227	11	10.983	0.7997	0.0557	0.0678	0.1197
BM2113	**9**	**9.000**	**0.8183**	**-0.0541**	**0.0127**	**-0.0407**
TGLA53	14	14.000	0.7889	-0.0714	0.0640	-0.0029
ETH10	7	7.000	0.7965	-0.0728	0.0841	0.0174
SPS115	8	8.000	0.6413	0.0184	0.0127	0.0309
TGLA126	8	8.000	0.7420	-0.0273	0.0615	0.0359
TGLA122	**16**	**15.932**	**0.8218**	**-0.1517**	**0.0441**	**-0.1009**
INRA23	8	8.000	0.7977	0.0438	0.0301	0.0725
ETH3	9	7.983	0.6651	0.0029	0.0650	0.0678
ETH225	8	7.949	0.7434	0.0129	0.0178	0.0304
BM1824	7	6.949	0.6783	0.1339	0.0155	0.1473
Media	**9.727**	**9.436**	**0.7539**	**-0.0116**	**0.0440**	**0.0329**

BIBLIOGRAFIA

1) Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., 32: 314-331.
2) d'Angelo , Ciani E., Sevi A., Albenzio M., Ciampolini R., Cianci D. (2006).The genetic variabilità of the Podolica cattle breed from the Gargano area. Preliminary results. Ital.J.Anim.Sci. Vol. 5, 79-85.
3) El Mousadik A., Petit R.J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [Argania spinosa (L. Skeels)] endemic to Morocco, Theor. Appl. Genet. 92: 832–836.
4) Excoffier L., Schneider G. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. 1:47-50.
5) Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
6) Hurlbert, S.H. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters, Ecology 52: 577–586.
7) Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology. 7: 639-655.
8) Moioli B., Napolitano F., Catillo G. (2004). Genetic Diversity between Piedmontese, Maremmana, and Podolica Cattle Breeds. Journal of Heredity 95(3):250–256
9) Rousset F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Mol Ecol Res 8:103–106.
10) Wright S. 1978. Variability within and among natural populations. Evolution and the genetics of populations 4. Chicago: University of Chicago Press.

SUMMARY

The authors present the preliminary results of the genetic characterization of Podolica cattle, based on 11 microsatellite markers as suggested by the ISAG panel 2003. In this study were analyzed 59 samples, collected in the district of Foggia for the following parameters: the observed and expected heterozygosity (0.76 and 0.78 respectively), the allele richness (9.44), the PIC value (0.75) and the fixation indices FIS, FST and FIT (-0.01, 0.04 and 0.03 respectively). Our findings could be explained due to the consanguinity in the herd, non random mating and the inbreeding practices. The aim of this research was biodiversity protection of this autochthonous breed.

Finanziamento: Fondi ricerca corrente 2007

Collaborazione tecnica:
Ester Valentina D'ADDETTA
Luisa CASILLO
Angela ACETI

EFFETTO DI ALCUNI PARAMETRI SULLA CRESCITA E SOPRAVVIVENZA DI *BRUCELLA MELITENSIS* IN RELAZIONE AL PROCESSO PRODUTTIVO DEI FORMAGGI OVINI TIPO "PECORINO SICILIAN0".

Scatassa M.L., Arcuri L.[(1)], Carrozzo A., Giosuè C., Lo Biundo G., Santacruz M., Todaro M.[(2)], Mancuso I., Stancanelli A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" – Palermo

[(1)] Azienda USL 6 Palermo

[(2)] Sezione di Produzioni Animali, Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo. – Università di Palermo

Key words: formaggi ovini, *B.melitensis*, sicurezza alimentare

SUMMARY

In Sicily, a very consumed typical cheese is made with raw sheep milk and ripened for short time. In the same time the brucellosis is present in the 12% of ovine farms. For that, different trials on some factors affecting the growth and survival of *B. melitensis,* simulating, further, the cheese processing conditions, were carried out. The pathogen survived and replicated. As a result, low concentration *of Brucella spp.* in the milk means high contaminated products. Cheese made with milk coming from not officially brucellosis undamaged farms causes a high risk for the consumers.

INTRODUZIONE

La maggior parte della produzione casearia ovina siciliana è costituita da formaggi che utilizzano una tecnologia di produzione sovrapponibile a quella del "Pecorino Siciliano DOP", ma con tempi di stagionatura notevolmente ridotti, al fine di ottenere prodotti freschi e meno caratterizzati dal punto di vista organolettico, per venir incontro ai gusti dell'attuale consumatore medio. Tali prodotti sono conosciuti commercialmente con i nomi di "Tuma" e "Primo Sale".

La legislazione vigente prevede che il latte destinato alla caseificazione provenga esclusivamente da allevamenti ufficialmente indenni da brucellosi. Per i formaggi ovini e caprini a latte crudo con stagionatura superiore a 60gg è possibile, in deroga alla normativa generale, utilizzare il latte di animali sani facenti parte di allevamenti non ufficialmente indenni. Tale latte deve comunque seguire percorsi separati e tracciati. La Brucellosi, malattia pressoché endemica del bacino del Mediterraneo, continua ad essere presente negli allevamenti siciliani nonostante, già dal 1992, siano stati attuati piani di controllo finalizzati all'eradicazione della malattia. Le informazioni epidemiologiche riguardanti la diffusione della malattia in Sicilia ed i risultati raggiunti dai piani di eradicazione sono riportati in Tabella 1. I dati regionali mostrano una realtà estremamente differenziata sia tra AUSL (intera provincia) (Graf. 1) sia, spesso, all'interno della stessa provincia. La rilevanza del fenomeno in ambito animale è confermata dal numero delle notifiche in campo umano (Graf. 2) (1). In questo contesto produttivo, caratterizzato da caseifici aziendali di piccole dimensioni, l'analisi del rischio relativa ai microrganismi patogeni non può non comprendere uno studio sul comportamento della *Brucella spp*. in relazione ai parametri tecnologici dei processi produttivi dei formaggi freschi ed a breve stagionatura. In letteratura esistono pochi dati sulle curve di crescita delle Brucelle in relazione alle varie temperature, e questo lavoro fornisce un contributo per approfondire le conoscenze sul potenziale rischio di contrarre la brucellosi attraverso il consumo dei prodotti caseari a breve stagionatura. In particolare, la tecnologia casearia tradizionale del "Pecorino" prevede una coagulazione presamica del latte crudo con caglio ovino o caprino in pasta, l'aggiunta di acqua calda per la rottura della cagliata e l'immissione della pasta nei canestri. Segue la fase di spurgo a temperatura ambiente per 1,5 – 2 h, tempo necessario alla lavorazione della ricotta ed all'ottenimento del suo sottoprodotto, la scotta, utilizzata per la cottura della pasta (2-10 h secondo le dimensioni della forma). Dopo 1-2 gg. di maturazione a temperatura ambiente, il prodotto può essere commercializzato tal quale (Tuma fresca) o a differenti gradi di salatura e maturazione (Tuma, Primosale, Pecorino Fresco) nell'arco di 10-50 gg.

MATERIALI E METODI

Nella fase preliminare dello studio sono state raccolte informazioni e dati analitici sui processi di caseificazione dei formaggi tipo "Pecorino", ampliando le indagini precedentemente svolte (2). A tale scopo, sono stati monitorati 88 processi produttivi in 22 caseifici della Sicilia occidentale. Tali indagini hanno permesso di definire i valori di temperature e pH del formaggio.

Per verificare i tempi e le temperature effettivamente raggiunte "a cuore" durante la fase di cottura sotto scotta, sono state condotte delle prove in caseifici aziendali e presso il Caseificio Sperimentale dell'IZS della Sicilia. A tal scopo, sono state prodotte forme con peso variabile fra 0,5 e 5 Kg, monitorando la temperatura della cagliata prima dell'immissione sotto scotta e, con cadenza di 30 minuti, la temperatura della scotta e "a cuore" del prodotto.

Per valutare il comportamento della *Brucella spp*. alle varie temperature, sono state allestite colture di *B. melitensis* biotipo 3 (agente eziologico maggiormente diffuso nella specie ovina in Sicilia), in Brodo Brucella alle concentrazioni 0,5 e 3,0 McFarland (MF) misurate con l'ausilio dello strumento DENSIMAT (bioMerieux). Tali brodo-colture sono state diluite 1:10, per ottenere un valore iniziale di 0 MF, prima di effettuare le prove di crescita.

Per valutare *in toto* l'alternarsi delle temperature e dei tempi tipici della lavorazione del formaggio sulla concentrazione delle brucelle, le brodo-colture (rispettivamente O,5 MF tal quale e diluito 1:10 e 2,8 MF tal quale e diluito 1:10) sono state sottoposte al seguente trattamento: 1 ora a 37°C (tempo di coagulazione e rottura della cagliata), 2 ore a temperatura ambiente - TA (fase di spurgo), 40 minuti a 45, 50 e 55°C (per valutare 3 diverse temperature di cottura sotto scotta), 48h a TA (22-25°C) e 3 giorni in cella di stagionatura a 12 °C (fase di maturazione). La scelta del metodo indiretto per la valutazione della concentrazione è stata condizionata da esigenze di riduzione del rischio biologico in laboratorio. Per valutare la presenza di brucelle vive e vitali sui brodi che presentavano una lettura al DENSIMAT pari a 0 MF e dopo i diversi trattamenti termici, le brodo-colture (100 µl) sono state seminate per spatolamento su piastre di Agar Sangue (AS) e Agar Brucella (AB) ed incubate a 37°C in atmosfera normale. Per confermare se la torbidità rilevata rifletteva quanto riportato in letteratura sulla concentrazione da assegnare ai valori McFarland, diluizioni scalari (in base 10) di una concentrazione 0,5 MF sono state seminate su AS, seguendo la metodica prima descritta. Il comportamento delle brucelle è stato verificato anche in brodo-colture acidificate a pH 6,3, valore minimo riscontrato in corso di lavorazione del formaggio tipo "Pecorino".

RISULTATI E DISCUSSIONE

I parametri tecnologici, rilevati nei processi produttivi monitorati, sono riportati in tabella 2. Le prove relative al monitoraggio della fase di cottura hanno mostrato che partendo da una scotta a temperatura di 73-85°C, la temperatura massima "a cuore" dei formaggi, indipendentemente dalla pezzatura, è stata raggiunta entro 2 ore. Le forme di peso maggiore (2-5 kg) hanno raggiunto una temperatura massima di 43-49°C e quelle di peso minore (0,5-1 kg) una temperatura più elevata (49-54 °C). E' stato evidenziato che, per effetto del naturale raffreddamento della

scotta, la temperatura massima raggiunta "a cuore" è mantenuta per non più di 30 minuti. E' da rilevare che le sperimentazioni sono state effettuate su forme di piccole dimensioni, mentre in commercio si trovano anche forme di 18-20 kg, nelle quali le temperature a cuore del prodotto sono sicuramente minori. La crescita delle brucelle, alle due concentrazioni e a varie temperature, è riportata nei grafici 3 e 4. L'inattivazione di *B. melitensis* si è avuta a temperatura di 54-55°C e; nel caso di concentrazioni elevate (3 MF), dopo 2 ore. Il trattamento tempo/temperatura che simula il processo produttivo del formaggio "Pecorino" ha evidenziato la sopravvivenza di *B. melitensis* (Tab. 3) pertanto è da ritenere che la presenza di *Brucella spp*. nel latte, anche se in basse concentrazioni, porta sempre alla produzione di un formaggio fortemente contaminato. La sperimentazione eseguita conferma l'elevato rischio legato al consumo di formaggi freschi ottenuti da latte prodotto in allevamenti non ufficialmente indenni da Brucellosi. In considerazione che la temperatura ed il pH non sono gli unici parametri ad influenzare la crescita e/o sopravvivenza della *Brucella spp.*, questo lavoro è propedeutico alla realizzazione di caseificazioni sperimentali a partire da latte contaminato con il patogeno in questione.

Tabella 1. Diffusione della Brucellosi ovina e caprina in Sicilia

	Allev.controllabili %	Allev. Controllati %	Allev. Infetti %
2003	8.759	98.73	17.83
2004	8.878	99.8	15.62
2005	8.927	99.68	15.37
2006	9.172	99.97	15.18
2007	9.017	99.33	14.15
2008	8.998	97.74	11.96
	Capi controllabili	Capi controllati %	Capi infetti %
2003	1.018.023	97.97	8.96
2004	1.021.064	99.17	7.36
2005	983.061	99.54	7.9
2006	952.067	99.98	4.88
2007	908.546	99.58	4.86
2008	914.924	97.79	4.09

Tabella 2. Parametri tecnologici - formaggio "Pecorino"

Parametri	**Media ± ds**
Temperatura di coagulazione (°C)	36,6±3
Tempo di coagulazione (minuti)	48±14
pH coagulo	6,5±0,1
Temperatura cagliata inizio spurgo (°C)	38,4±3
Durata spurgo a Temp. ambiente (minuti)	78±25
Temperatura scotta (°C)	72,5±8

Tabella 3. Simulazione delle condizioni di produzione del formaggio tipo "Pecorino"

(MF)	Trattamento tempo/temperatura							
	1h 37°C	2h TA	40' 45°C	40' 50°C	40' 54°C	24h TA	24h TA	72h 12°C
0,5	0,5	0,5	0,5			0,7	1,1	1,6
0,5(1:10	0	0,1	0,1			0,2	0,4	0,6
0,5 1:10	0	0,1		0,1		0,1	0,2	0,4
0,5 1:10	0,1	0,1			0,1	0,2	0,1	0,1
2,8	2,8	3,0	3,1			3	3,3	3,5
2,8 1:10	0,4	0,6	0,5			0,8	1	1,6
2,8 1:10	0,5	0,5		0,4		0,6	0,7	1,3
2,8 1:10	0,4	0,6			0,4	0,4	0,5	0,6

Grafico 1 Prevalenza brucellosi aziende ovi-caprine anni 2004-2007

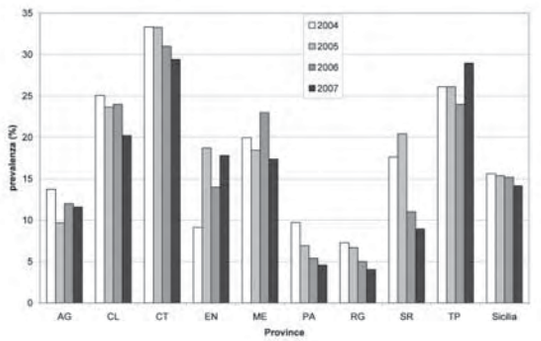


Grafico 2 Andamento dei casi umani di Brucellosi (2003-2006)

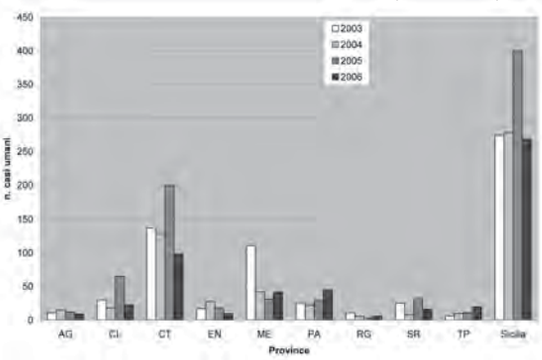


Grafico 3. crescita *B. melitensis* alta concentrazione – 0,5 MF (1:10)

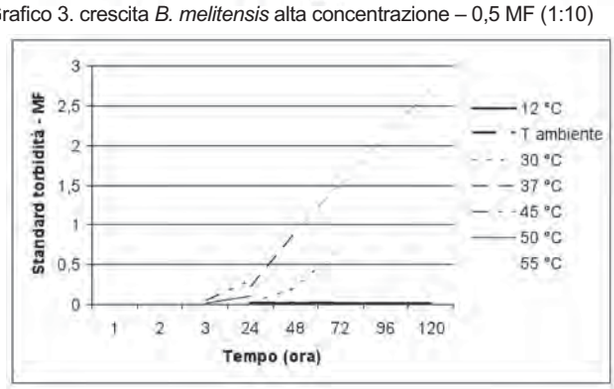
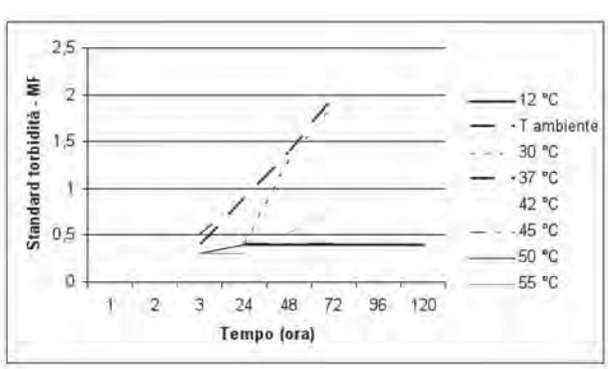


Grafico 4. crescita *B. melitensis* alta concentrazione - 3 MF (1:10)



BIBLIOGRAFIA

1)http://www.ministerosalute.it/
2) Scatassa M. L., Costa A., Ciaccio S. P., Di Noto A. M. Formaggio Pecorino: processo produttivo ed indagine microbiologica. Atti Convegno Fe.Me.S.P.Rum 2005; http://www2.vet.unibo.it/staff/gentilefemesprumdf%20Congressi/XIII%20congress%20Bari/Scatassa.pdf

Ringraziamenti
Lavoro eseguito con fondi del progetto ricerca corrente "Valutazione e analisi dei rischi per il consumatore di prodotti lattiero caseari preparati con latte ovi-caprino di assumere *Brucella melitensis* con la dieta". Si ringraziano i Sigg. S. Alfano, S. Marceca e M. Saladino per la preziosa collaborazione tecnica.

ISOLAMENTO DI *STAPHILOCOCCUS AUREUS* IN CAMPIONI DI LATTE: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E RELAZIONI CON IL CONTENUTO IN CELLULE SOMATICHE

Scatassa M.L., Mancuso I., Arcuri F., Carrozzo A., Ducato B., Giosuè C., La Giglia M., Lo Biundo G., Guerrero L., Vitale M., Stancanelli A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" – Palermo

Key words: *S. aureus*, latte, caratterizzazione molecolare

SUMMARY

It is well known that *S. aureus* is one of the major responsible in the etiology of clinical ruminant mastitis. Its presence is related with an increase of somatic cell count (SCC) in the milk. With the aim of evaluating the relationship between this milk parameter and virulence factors of *S. aureus* an analysis for the polymorphic gene of the bacterial coagulase has been performed on strains isolated from different farms. No correlation can be established between SSC number and coagulase amplicon size but further analysis are in progress with a larger number of isolates.

INTRODUZIONE

Nell'ambito delle attività di controllo e profilassi delle mastiti svolte dal Centro Latte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia è stato più volte evidenziato come *Staphylococcus aureus*, uno dei principali agenti di mastiti cliniche, sia correlato con un aumento del contenuto in cellule somatiche (SCC) (1). Si è ritenuto utile, pertanto, sottoporre i ceppi di *S.aureus* isolati ad indagini di tipo biomolecolare per una più approfondita caratterizzazione dei microrganismi circolanti.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta su 262 campioni di latte, positivi all'isolamento di *S.aureus,* prelevati da allevamenti bovini, ovini e caprini. I campioni provenivano da 96 aziende zootecniche dislocate nel territorio siciliano come riportato in tab. 1.

Sui campioni di latte è stato eseguito il conteggio delle cellule somatiche in citometria di flusso e l'isolamento dei principali agenti mastidogeni. Sono stati seminati 10 µl di latte su Agar Sangue ed MSA (Mannitol Salt Agar), dalle colonie che presentavano l'aspetto tipico di *S.aureus* si è procedendo alla successiva tipizzazione con prove biochimiche ed enzimatiche in macro e micrometodo.

Successivamente i ceppi di *S. aureus* sono stati inviati al laboratorio di biologia molecolare per la caratterizzazione molecolare.

Il DNA del campione è stato estratto utilizzando il kit (PureLink Genomic DNA-Invitrogen) e seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'amplificazione del DNA (PCR) è stata effettuata utilizzando primers (Invitrogen) localizzati in una zona conservata del gene della coagulasi che si estende al di là della regione polimorfica (variabile) COA forward (5' ATA GAG ATG CTG GTA CAG G 3') COA reverse (5' GCT TCC GAT TGT TCG ATG C3') (2 e3).

Il DNA (1ml) estratto è stato aggiunto ad una miscela di reazione della PCR contenente 0,4mM di ciascun primer, 5ml di tampone 10X, 0,25 mM di ciascun desossinucleotide trifosfato (100 mM dNTPs set- Invitrogen) e 2,5 unità di Taq DNA polymerase ricombinante (Invitrogen) in un volume finale di 50 ml di acqua distillata sterile.

Ciascun campione è stato sottoposto a 30 cicli di amplificazione, ciascuno costituito da 50'' a 94°C, 30'' a 57°C, 30''a 72°C. I campioni amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio (Star Lab – Cat. N3101-0500) all' 1%. Il risultato della PCR corrisponde a una delle possibili bande amplificate: 875 ±10bp **(SA),** 700 ±20 bp **(SB)**, 603±20 bp **(SC),** 547 ±15 bp **(SD)**.

I risultati della caratterizzazione molecolare dei ceppi di *S. aureus* sono stati messi in relazione alla specie animale e al contenuto in cellule somatiche dei campioni di latte (media geometrica).

I campioni di latte misto ovino-caprino e caprino, dato l'esiguo numero, sono stati aggregati ai campioni ovini per l'analisi dei dati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tab. 1 è riportato il numero di aziende oggetto dello studio suddivise per provincia.

Tabella 1. Aziende – Distribuzione per provincia.

Provincia	Aziende bovine N.	Aziende Ovine N.	Aziende caprine N.	Aziende ovi-caprine N.	**Totale** N.
Palermo	28	10	4	2	**44**
Agrigento	2	14	-	1	**17**
Messina	13	-		4	**17**
Caltanissetta	5	4			**9**
Trapani	1	4		1	**6**
Enna	3	-			**3**
Totale	**52**	**32**	**4**	**8**	**96**

I campioni di latte analizzati appartenevano soprattutto alla specie bovina (47 %) e ovina (46 %) la restante parte era rappresentata da campioni caprini (3 %) e ovi-caprini (4 %).

La suddivisione dei campioni per specie e per provincia è riportata nella Tab. 2

Tabella 2 – Campioni di latte analizzati

Provincia	Latte bovino N.	Latte ovino N.	Latte caprino N.	Latte ovi-caprino N.	**Totale N**.
Palermo	83	17	6	2	**108**
Agrigento	2	89	-	1	**92**
Messina	29	1	1	4	**35**
Caltanissetta	6	4	-	-	**10**
Trapani	1	10	-	3	**14**
Enna	3	-	-	-	**3**
Totale	**124**	**121**	**7**	**10**	**262**

La caratterizzazione molecolare *di S. aureus*, sulla base dell'amplificazione del gene della coagulasi*,* ha mostrato la presenza di 4 amplificati diversi denominati SA, SB, SC ed SD.

Il tracciato elettroforetico su gel agarosio 1% della PCR del gene della coagulasi di *S.aureus* isolati da campioni di latte ovino è riportato nella Foto 1.

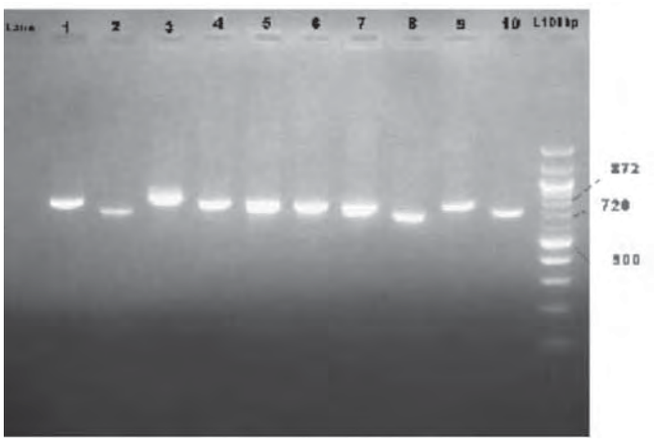


Foto 1 gel di agarosio - PCR gene COA.
In lane 10 controllo positivo (ceppo ATCC n°25923); in lane 1 e 3 prodotti di PCR della misura di 872b (SA); in lane 2 e 8 amplificati della misura di 730 bp (SB); i restanti campioni presentano un amplificato di 700 bp (SC).

I ceppi di *S. aureus* isolati da campioni di latte bovino, nel 40% dei casi presentavano il frammento del gene della coagulasi SA, seguito dai ceppi SC (24 %), SD (21 %) ed SB (15 %).
Gli stafilococchi isolati da campioni di latte ovino e caprino, considerati nel complesso, hanno presentato percentuali di polimorfismi del gene della coagulasi SB più alti (49 %), seguiti dai ceppi SC (36%), SA (13%) e SD (2 %).
Il contenuto medio in cellule somatiche, rispetto ai polimorfismi genetici, è riportato in tab. 3.
I risultati mostrano una certa variabilità del contenuto in cellule somatiche in relazione al genotipo COA individuato ed alla specie animale. Considerato che il numero dei campioni analizzato è esiguo e non omogeneo per polimorfismi non è possibile, ad oggi, associare una diverso potere patogeno ai ceppi di *S. aureus* isolati.

Tabella 3. Contenuto in cellule somatiche e caratterizzazione molecolare

Specie	Caratterizzazione molecolare	N. campioni	Contenuto in cellule somatiche /ml (media geometrica)
Bovina	SA	49	436.500
	SB	19	457.100
	SC	30	724.400
	SD	26	512.900
Ovina e caprina	SA	18	2.041.700
	SB	67	2.138.000
	SC	50	1.122.000
	SD	3	1.047.100

Solo in pochi allevamenti è stata evidenziata la presenza contemporanea di ceppi di *S.aureus* con gene della coagulasi diverso.

Ulteriori indagini sono in corso al fine di aumentare la numerosità campionaria per poter eventualmente mettere in evidenza la presenza di ceppi con affinità di specie e/o a diverso potere patogeno.
Ulteriore obiettivo è mettere a punto metodiche per lo studio di polimorfismi sull'intero genoma ed estendere l'indagine agli stafilococchi coagulasi negativi che sempre più frequentemente vengono isolati da campioni di latte e considerati agenti di mastite subclinica.

BIBLIOGRAFIA

1) Scatassa M.L., Guarneri G., Arcuri F., Carrozzo A., Ducato B. Caracappa S. (2008) "Latte ovino: contenuto in cellule somatiche ed isolamenti batterici" Atti SISVET, LXII, 471-472
2) Goh S.H., Byrne S.K.,Zhang J.L., Chow A.W. 1992 Molecular typing of *Staphylococcus aureus* **on the basis of coagulase gene polymorphisms. J. Clin.Microbiology 30: 1642-1645.**
3) Akineden O, Annemuller C., Hassan A.A. Lammler C. Wolter W. and Zschock M. 2001 Toxin gene and other characteristic of *S. aureus* **isolates from milk of cows with mastitis Clinical and diagnostic laboratory immunology, Sept 2001 p 959-964.**

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i Sigg. S. Alfano E. Giangrosso e M. Saladino per la preziosa collaborazione tecnica.

IDIOPATHIC VESICULAR DISEASE (IVD): SEGNALAZIONE DI UN CASO IN UMBRIA

Sensi M. [1], **Catalano A.** [2], **Salvatori-Franchi F.** [2], **Orsini S.** [1], **Marchi S** [1]., **Tinaro M.** [1], **Pecorelli I**[1]., **Costarelli S.**[1]
[1]*Istituto Zooprofilatico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche*
[2]*ASL 2 Perugia, Distretto del Trasimeno*

Key words: Lesioni vescicolari, suini

SUMMARY
Since October 2008, thirty outbreaks of Swine Vesicular Disease (SVD) were registered in Umbria region. During the same period, in a fattening herd, vesicular lesions on snout were seen on animals. Due to the type of lesions and the epidemiological territorial reality the Local Veterinary Service immediately suspected another SVD outbreak onset. The farm visit and successive laboratory investigations ruled out SVD infection and open new interesting diagnostic hypothesis.

INTRODUZIONE
Nell'ottobre 2008 in Umbria si sono verificati numerosi focolai di Malattia Vescicolare del Suino che hanno portato alla sospensione dell'accreditamento della Provincia di Perugia. L'ultimo focolaio è stato individuato nel mese di Marzo in località Montecchio, nel Comune di Tuoro sul Trasimeno (PG), con conseguente emanazione delle ordinanze di Zona di Protezione e Zona di Sorveglianza. Nello stesso periodo, in un allevamento da ingrasso, sito all'interno della Zona di Sorveglianza, in occasione della visita clinica ai fini della movimentazione per il macello, venivano osservate, in alcuni animali, lesioni vescicolari sul grugno. La presenza delle lesioni e la particolare situazione epidemiologica del territorio hanno fatto immediatamente temere l'insorgenza di un ennesimo focolaio di MVS. Il sopralluogo ed i successivi accertamenti analitici hanno permesso di escludere l'infezione da Malattia Vescicolare ed aperto nuove ipotesi diagnostiche.
Scopo del presente lavoro è di descrivere l'episodio ed illustrare le modalità con le quali si è arrivati ad emettere diagnosi di Idiopathic Vesicular Disease (IVD) del suino.

MATERIALI E METODI
Nella terza decade di Aprile 2009, in un allevamento sito in località Pieracci di Castiglione del Lago, all'interno di una Zona di Sorveglianza per Malattia Vescicolare Suina, il veterinario ASL competente per territorio, in occasione della visita clinica obbligatoria ai fini della movimentazione in deroga per il macello, notava lesioni simil-vescicolari sulla parte superiore del grugno in un elevato numero di soggetti.
Immediata è stata la comunicazione alle autorità competenti le quali hanno predisposto le misure di sequestro cautelativo dell'allevamento.
L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale territoriale, in collaborazione con i colleghi della ASL, ha effettuato il sopralluogo e la relativa indagine epidemiologica. In quest'occasione sono stati eseguiti prelievi ufficiali di sangue e di feci per la conferma del sospetto di Malattia Vescicolare.
A distanza di due giorni è stato fatto un ulteriore sopralluogo in azienda.
Nel corso di tale sopralluogo sono stati prelevati 16 campioni di sangue, in toto ed in EDTA, dagli animali che presentavano le lesioni più evidenti. Sono stati prelevati n° 5 campioni di mangime da 4 mangiatoie e dal silos e scattate alcune fotografie (foto 1, 2). E' stata rilevata, inoltre, la temperatura corporea a 12 soggetti (con lesioni e non).
I campioni di sangue sono stati sottoposti ad accertamenti chimico-clinici, emocromocitometrici e alla valutazione della formula leucocitaria: Dai mangimi è stata determinata la concentrazione di Aflatossine, di Deossinilvalenolo (DON), di di Fumonisina (FB1), di Tossina T2 e Zearalenone (Zea).

RISULTATI E DISCUSSIONI
Le lesioni, rilevate in circa il 20% dei suini dell'allevamento, erano localizzate sul grugno e/o sulla sua parte dorsale; assenti in corrispondenza del cercine coronario ed all'interno della cavità orale. Il loro aspetto era irregolare per forma (circolari, a "V", a semiluna) (Fig. 1), delle dimensioni di circa 3-4 millimetri e prevalentemente di colore ambrato.

Fig. 1 Lesioni a forma di "V"

Nessuno degli animali controllati, (con e senza lesioni), presentava rialzo febbrile (T° 38,5 – 39,3).
Il mangime utilizzato era stato acquistato dal commercio e, a detta del proprietario dell'allevamento, non molto appetito dagli animali. L'indagine epidemiologica aveva evidenziato che erano rispettate le principali norme di biosicurezza. L'ultimo ingresso di animali risaliva ai primi di settembre 2008 e l'ultima uscita per il mattatoio al mese di dicembre 2008. I campioni di sangue, prelevati dal Servizio Veterinario della ASL durante il primo sopralluogo, sono stati sottoposti a test ELISA di screening per Malattia Vescicolare Suina presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche. Un'aliquota degli stessi campioni di sangue ed i campioni di feci sono state inviati all'Istituto Zooprofilattico di Brescia per gli accertamenti sierologici e virologici nei confronti del virus aftoso. Tutti i campioni hanno dato esito negativo sia per MVS che per Afta.
I risultati dei parametri chimico-clinici non hanno evidenziato particolari alterazioni degne di nota.
I livelli di micotossine rilevati, riportati nella Tabella 1, non sono tali da giustificare la sintomatologia clinica presente, anche se la concentrazione di FB1 e di DON in alcuni campioni potrebbe acquisire una certa significatività.

Reparto	Afla. B e G mg/Kg	DON mg/Kg	FB1 mg/Kg	T – 2 mg/Kg	Zea. mg/Kg
Cap. B b.4	0,002	0,37	4,82	0,047	<0,02
Cap. B b.3	<0,002	0,39	5,62	0,050	0,03
Cap. D b.E	<0,002	1,18	5,20	0,065	<0,02
Cap. D b.4	<0,002	0,89	6,40	0,052	0,03
Silos B	0,002	0,46	6,85	0,061	<0,02

Tab. 1 Esiti dei controlli effettuati sul mangime

Nel passato, tuttavia, sono stati riportati casi, di suini in accrescimento (magroncelli), in cui la comparsa di piccole vescicole, localizzate prevalentemente sul grugno e nel cavo orale, era dovuta alla contemporanea presenza di tossina T-2 (che ha una potente azione irritativa del derma e della mucosa del cavo orale), di vomitossina e fumonisina (9).

Negli ultimi due anni, abbiamo avuto modo di rilevare manifestazioni cliniche simili, in altri due allevamenti umbri, sempre nel periodo primaverile. Nel primo evidenziammo livelli elevati di DON e Zearalenone nell'alimento, mentre nel secondo registrammo l'inclusione di un prodotto acidificante, in concentrazione elevata, nel mangime utilizzato.

Alla luce di quanto descritto e delle esperienze di campo avute, riteniamo di poter ipotizzare che l'episodio patologico da noi osservato possa essere ricondotto a quella forma morbosa che viene definita Malattia Vescicolare Idiopatica (IVD) che, sporadicamente, può manifestarsi all'interno di allevamenti di suini (4, 9). Questa malattia, segnalata anche in Australia (1), Nuova Zelanda (3), Canada (10) e Stati Uniti d'America (2, 4), ha un andamento stagionale con picco di frequenza nel periodo che va dalla primavera all'autunno. Pur non essendo una patologia debilitante per l'animale colpito, né economicamente pesante per l'allevatore, l'IVD ha un significato diagnostico differenziale di fondamentale importanza, in quanto la sintomatologia clinica da essa sostenuta, è perfettamente sovrapponibile a quella indotta dal virus della Malattia Vescicolare del Suino, dell'Afta Epizootica (3), e delle altre malattie vescicolari inserite nella Lista dell'OIE. In sede di diagnosi differenziale, devono essere prese in considerazione anche l'infezione da Enterovirus del suino del gruppo III (6), la Parvovirosi (5, 7, 8), l'infezione da Calicivirus, le micotossicosi (soprattutto da T–2) e la fotodermatite da furocumarina a seguito dell'assunzione di cataboliti del fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Non va tuttavia trascurato l'intervento di "fattori predisponenti" insiti nella realtà di allevamento. In questa circostanza, infatti, la particolare natura del dispositivo di abbeverata, costituito da un "ciucciotto ad alta pressione" con punta particolarmente sottile, inserito all'interno della mangiatoia ("mangia e bevi"), potrebbe aver contribuito ad aggravare e complicare il quadro sintomatologico. Gli animali, infatti, costretti a premere con il grugno su questo dispositivo potrebbero essersi procurate delle irritazioni e delle escoriazioni che in alcuni casi simulavano la rottura di vescicole (Fig. 2).

Fig. 2 Vescicole rotte

Tutto ciò ha contribuito ad aggravare la manifestazione clinica di IVD, di per sé stessa allarmante, soprattutto in un periodo in cui tutti gli sforzi del Servizio Sanitario Umbro erano tesi alla riacquisizione dell'indennità da Malattia Vescicolare del Suino dopo i focolai verificatisi nell'autunno 2008 - primavera 2009.

BIBLIOGRAFIA

1. Munday BL, Ryan FB. Vesicular lesion in swine_ possible association with the feeding of marine products. Aust vet J 1982; 59(6):193.
2. Gibbs EPJ, Stoddard HL, Yedloutchnig RJ, House JA, Legge M, A vesicular disease of pigs in Florida of unknown etiology. Florida Vet J 1983; 12:25-27.
3. Montgomery JF, Oliver RE, Poole WSH. A vesiculo-bullous disease in pigs resembling foot and mouth disease. I. field cases. NZ Vet J 1987; 35.21-26.
4. Amass SF, Schneider JL, Miller CA, Shawky SA, Stevenson GW, Woodruff ME. Idiopathic vesicular disease in a swine herd in Indiana. J Swine Health prod 2004; 12(4):192-196.
5. Kresse JL, Taylor WD, Stewart WW, Eernisee KA. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. Vet Microbiol 1985; 10:525-531.
6. Knowles NJ. The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue. Vet Rec 1988; 122:441-442.
7. Lager KM, Mengeling WL. Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. J Vet Diagn Invest 1994; 6:357-359.
8. Whitaker HK, Neu SM, Pace LW. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. J Vet Diagn Invest 1990; 2:244-246.
9. Osweiler GD. Mycotoxins. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire SD, Taylor DJ, eds. Diseases of Swine. 9th ed. Ames: Blackwell publ, 2006:915-929.
10. Pasma T, Davidson S, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. CVJ/Vol49/January 2008.

PROCEDURE DI VALIDAZIONE DEI METODI DI PROVA PER L'ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* SPP. DA MATERIALE BIOLOGICO E VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DEI TERRENI COLTURALI UTILIZZATI

Soncin A.R., Zoppi S., Pinto L., Dondo A., Grattarola C.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Keywords: *Salmonella* – bacteriological test – validation protocol

INTRODUZIONE

L'accreditamento e la certificazione coinvolgono tutta la rete degli Istituti Zooprofilattici, che tramite i propri Laboratori hanno dovuto affrontare criticità e trovare soluzioni corrispondenti ad una realtà evoluta basata sul confronto e sulla confrontabilità.
La cultura della "Qualità", intesa come criterio operativo-analitico e quindi come garanzia del dato fornito, si è andata progressivamente diffondendo negli ultimi anni.
Oggi la maggior parte dei degli Istituti operano in conformità agli standard internazionali di garanzia di qualità dettati dalla norma ISO 17025 (1), attraverso le proprie strutture laboratoristiche che hanno conseguito l'accreditamento SINAL .
La corretta attuazione della norma ISO 17025 diviene una condizione indispensabile nei "laboratori di prova".
Una delle problematiche di maggiore significato nella pratica analitica di laboratorio, derivante dall'evoluzione normativa, è l'esigenza di validare i metodi di analisi.
La validazione dei metodi rappresenta quindi una fase operativa fondamentale per garantire l'attendibilità dei risultati.
Secondo la ISO 17025 al punto 5.4.5 'Validazione dei metodi' devono essere validati:

- ✓ i metodi non normalizzati
- ✓ i metodi sviluppati in laboratorio
- ✓ i metodi normalizzati utilizzati al di fuori del proprio scopo e campo di applicazione prefissato
- ✓ le estensioni e le modifiche dei metodi normalizzati

In quest'ottica presso i Laboratori della Diagnostica Generale dell'IZS P.L.V.A. si è proceduto alla validazione dei metodi per l'isolamento di *Salmonella* spp. da materiale biologico, sfruttando i campioni pervenuti nel corso dei ring trials organizzati dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi di Padova (IZSVE).
Dai risultati ottenuti dalle prove è stato possibile effettuare una serie di valutazione tecniche legate alla diversa risposta alla positività fornita dai vari terreni utilizzati per l'esecuzione della prova.

MATERIALI E METODI

Sono stati effettuati gli esami batteriologici per l'isolamento di *Salmonella* spp., utilizzando le metodiche in uso presso il Laboratorio di Patologia Animale, da 30 campioni fecali pervenuti in laboratorio nell'ambito dei ring trials degli anni 2006 e 2008.
Come da protocollo, ai campioni è stata addizionata Acqua Peptonata (BPW) e una lenticola, contenente diversi livelli di carica batterica di *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, o priva di microrganismi, e sono stati incubati a 37°C per 18h.
Successivamente i campioni sono stati seminati sui seguenti terreni: Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV), Rappaport Vassiliadis Broth (RVSB), come indicato nel ring trial e in aggiunta su Selenite Cystine Broth (SC) e Muller Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn). Il tempo e la temperatura d'incubazione variavano a seconda del terreno di coltura: MSRV e RVSB a 42°C rispettivamente per 48 ore e per 24 ore, SC e MKTTn a 37°C per 24 ore.
Dai terreni liquidi è stata poi eseguita una semina per isolamento su Brilliant Green Agar (BGA) e Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) con incubazione delle piastre a 37°C per 24 ore. Si è infine proceduto alla lettura delle piastre e alla conferma delle colonie sospette.

RISULTATI

Dai dati pervenuti dal Centro di Referenza Nazionale, su 30 campioni esaminati, 24 erano positivi e 6 negativi.
I risultati complessivi ottenuti dalla nostra unità operativa hanno confermato quelli attesi.
Analizzando singolarmente i terreni utilizzati per le prove i risultati sono stati i seguenti:

- ✓ il terreno semisolido MSRV associato sia al terreno XLD che al terreno BGA ha confermato la positività in 24 casi (100%)
- ✓ il terreno RVSB associato al terreno BGA ha confermato la positività in 20 casi (83,3%) e associato al terreno XLD in 7 casi (29,1%)
- ✓ il terreno SC associato al terreno BGA ha confermato la positività in 17 casi (70,8%) e associato terreno XLD in 5 casi (20,8%)
- ✓ il terreno MKTTn associato al BGA ha confermato la positività in 20 casi (83,3%) e associato al terreno XLD in 18 casi (75%).

In tabella n. 1 sono riportati i valori di Sensibilità, Specificità e concordanza tra i terreni liquidi e i terreni solidi, calcolati attraverso l'utilizzo del Win Episcope v. 2.0.

Tabella n. 1: prestazioni in termini di sensibilità (SE) e di specificità (SP) delle differenti combinazioni di terreni colturali. Nell'ultima colonna di destra viene riportato il dato di concordanza

Terreno	SE	SP	K di Cohen
RVSB-BGA	83%	100%	0.66 (L.C. 95%; I.C. 0.38÷0.95)
RVSB-XLD	26%	100%	0.14 (L.C. 95%; I.C. 0.03÷0.27)
SC-BGA	70%	100%	0.49 (L.C. 95%; I.C. 0.20÷0.77)
SC-XLD	21%	100%	0.09 (L.C. 95%; I.C. -0.09÷0.2)
MKTTn-BGA	83%	100%	0.66 (L.C. 95%; I.C. 0.38÷0.95)
MKTTn-XLD	75%	100%	0.54 (L.C. 95%; I.C. 0.25÷0.83)
MSRV-BGA	100%	100%	1 (L.C. 95%; I.C. 1÷1)
MSRV-XLD	100%	100%	1 (L.C. 95%; I.C. 1÷1)

Mettendo in relazione, insieme, tutti i terreni liquidi (RVSB, MKTTn e SC) con, rispettivamente, i terreni solidi BGA e XLD si ottiene una sensibilità pari per il terreno BGA al 95% (I.C. 95% esatto e asintotico: 0.78÷0.99) e per il terreno XLD pari al 75% (I.C. 95% esatto e asintotico: 0.53÷0.90).

DISCUSSIONE

All'interno del Sistema Qualità dei laboratori della Diagnostica Generale della Sede di Torino dell'IZS PLVA, l'esecuzione delle prove descritte ha permesso, grazie ai risultati ottenuti, di procedere alla validazione dei due metodi di prova utilizzati per l'isolamento di *Salmonella* spp. da materiale biologico, sia sfruttando la metodica che prevede l'utilizzo del terreno semisolido MSRV (2) che sfruttando la metodica che prevede l'utilizzo di terreni liquidi di arricchimento selettivo, basato su un metodo interno (3).

Dai risultati si evince che l'associazione del terreno semisolido MSRV, sia con il terreno BGA che con il terreno XLD, ha dimostrato perfomance di sensibilità e specificità pari al 100% e grado di concordanza ottimo (K=1).

È stato, inoltre, possibile effettuare un calcolo della sensibilità complessiva fornita dai 3 terreni liquidi rispetto ai 2 terreni solidi utilizzati, BGA e XLD.

Il terreno BGA, associato ai diversi terreni liquidi (RVSB, SC e MKTTn) ha dimostrato performance di sensibilità superiori rispetto al terreno XLD associato ai medesimi terreni liquidi (75%÷83% vs 21%÷ 75%).

Il parametro della specificità sia per il terreno BGA che per il terreno XLD è risultato pari al 100%.

Per quanto riguarda il grado di concordanza, a seconda delle varie associazioni, abbiamo ottenuto risultati estremamente variabili da un terreno ad un altro (vedi tabella 1).

Il presente lavoro oltre ad essere stato di supporto per la validazione delle nostre metodiche ci ha permesso di trarre ulteriori valutazioni tecniche sui protocolli in uso; infatti, nelle metodiche di isolamento di *Salmonella* spp. da materiale biologico è necessario prevedere l'associazione di almeno 2 terreni liquidi di arricchimento selettivo per aumentare la possibilità di isolare il microrganismo, mentre sarebbe possibile utilizzare un unico tipo di terreno agarizzato.

Le metodiche in uso nei laboratori diagnostici dell'IZS PLVA prevedono infatti il contemporaneo utilizzo di 2 terreni liquidi (SC associato a MKTTn, oppure SC associato a RVSB), aumentando quindi la sensibilità del metodo.

La sensibilità di RVSB associato a SC (utilizzando contemporaneamente entrambi i terreni solidi BGA e XLD) risulta analoga a quella dell'Mkttn associato a SC (BGA e XLD) e pari al 75% (47-100 L.C. 95%).

Inoltre, in ultima analisi, sulla base dei risultati preliminari ottenuti, considerando l'utilizzo di un singolo terreno agarizzato (BGA o XLD) in associazione a un terreno liquido, il BGA garantirebbe ottime performance in termini sia di sensibilità che di specificità, mentre sarebbe necessario prevedere una valutazione più attenta in merito all'utilizzo del terreno XLD, in questo caso verrebbero snellite le procedure d'isolamento e ridotti i costi analitici.

BIBLIOGRAFIA

1. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
2. ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Annex D: Detection of Salmonella spp in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage ISO6579
3. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Ediz. 2008, capitolo 2.9.9

ABSTRACT

Quality control is a measure of precision or how well the measurement system reproduces the same result over time and under varying operating conditions. Our laboratories need to have this requisites. This study reports how we carried out the assessment of the Standard Operative Procedure regarding the isolation of *Salmonella* spp. from biological samples in order to give an available example of validation protocol for veterinary methods.

ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN BATTERI GRAM-NEGATIVI ISOLATI DA TAMPONI AURICOLARI DI CANI DI PROPRIETÀ E DI CANILE

Spaggiari B.[1], Gherpelli Y.[1], Carnevali L.[2], Luppi A.[1], Bonilauri P.[1], Dottori M.[1]
[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Sezione di Reggio Emilia
[2] Area Dipartimentale di Sanità Pubblica Veterinaria – A.U.S.L. di Reggio Emilia

Parole chiave: antibiotico-resistenza – cane – tampone auricolare

ABSTRACT
During routine activity of IZSLER-Reggio Emilia General Diagnostics Laboratory 386 ear swabs were collected from individually owned dogs and kennel dogs. Samples were cultured and bacterial and yeast populations were isolated. Gram-negative bacteria were identified by bacteriological methods and tested for antimicrobial susceptibility. This study aims at determining and comparing antimicrobial susceptibility patterns of Gram-negative bacteria between individually owned and kennel dogs.

INTRODUZIONE
Il monitoraggio sistematico dei fenomeni di resistenza agli antimicrobici tra i batteri isolati dagli animali, dall'uomo e dagli alimenti viene effettuato in diversi stati europei ed i risultati di tale attività sono pubblicati ogni anno dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). Cionondimeno, i dati relativi all'antibiotico-resistenza nei batteri isolati da animali da compagnia sono scarsi (1, 2).
La ridotta o assente sensibilità agli antimicrobici ha assunto una crescente importanza anche in medicina veterinaria, sia negli animali da reddito che in quelli da compagnia (7, 8). Ma, mentre l'uso degli antimicrobici negli animali da reddito è soggetto a limitazioni in molti paesi, la terapia antibiotica negli animali da compagnia è rimasta per lo più non regolamentata. I fenomeni di antibiotico-resistenza negli animali da compagnia possono avere implicazioni anche per la salute umana. Infatti, la condivisione di ambienti comuni e lo stretto contatto tra piccoli animali e uomo sottendono la possibilità di trasmissione di germi resistenti dagli animali stessi all'uomo, anche in considerazione del fatto che virtualmente le stesse classi di agenti antimicrobici sono utilizzate in medicina umana e nella clinica dei piccoli animali (3). I microrganismi più frequentemente isolati nel condotto uditivo del cane sono *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., ed *Escherichia coli* per quanto riguarda i batteri, ed il lievito *Malassezia pachydermatis*. Nelle otiti i batteri appartenenti alle famiglie *Enterobacteriaceae* **e** *Pseudomonadaceae* assumono un ruolo opportunistico determinando processi infiammatori cronici spesso refrattari ai trattamenti antibiotici. *Pseudomonas* spp. in particolare si caratterizza per la multi-resistenza agli antimicrobici (*multiple-drug resistance***,** MDR) derivante dall'innata resistenza del batterio ai beta-lattamici associata all'acquisizione di mutazioni genetiche ed al trasferimento di geni codificanti per l'antibiotico-resistenza (7).
Durante la attività routinaria del Laboratorio di Diagnostica Generale della sezione IZSLER di Reggio Emilia sono state osservate notevoli differenze nella risposta agli antimicrobici da parte dei batteri isolati da tamponi auricolari di cani di proprietà rispetto a cani ricoverati presso il canile. Sulla base di queste osservazioni è stato effettuato un approfondimento diagnostico mediante un'indagine retrospettiva sugli esami batteriologici eseguiti nei mesi precedenti da tamponi auricolari di cane. Nel presente lavoro vengono presentati e confrontati i dati relativi alla suscettibilità *in vitro* agli antibiotici di 57 ceppi di batteri Gram-negativi isolati da tamponi auricolari di cani di proprietà e di canile nel periodo gennaio 2008-aprile 2009.

MATERIALI E METODI
È stato effettuato l'esame colturale su un totale di 386 tamponi auricolari di cani, dei quali 83 di proprietà e 303 ricoverati presso il canile municipale di Reggio Emilia. I campioni sono stati ottenuti mediante tamponi cotonati inumiditi con soluzione fisiologica e conservati a 4°C in un terreno di trasporto (Stuart transport medium, Oxoid, Basingstoke, UK) fino all'invio al laboratorio. I tamponi sono stati sottoposti ad esame batteriologico su terreni solidi (agar sangue e Gassner agar) con incubazione a 37°C per 24-48 ore. L'identificazione batterica è stata effettuata mediante l'osservazione macroscopica delle colonie e l'osservazione microscopica dei germi dopo colorazione di Gram. Ove necessari si sono utilizzati test biochimici per la tipizzazione. Gli isolati batterici sono stati ritenuti implicati nel determinismo dell'infezione auricolare in caso di abbondante crescita di singole specie batteriche in coltura mista oppure di moderata crescita di singole specie in coltura pura. La determinazione della sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici isolati è stata eseguita attraverso il metodo della diffusione da dischetto Kirby-Bauer su Müller-Hinton agar secondo le linee guida della NCCLS (6). I risultati intermedi di sensibilità ottenuti sono stati considerati come resistenti nella rielaborazione dei dati. Le differenze nelle sensibilità agli antibiotici tra i due gruppi sono state confrontate tramite test Fisher exact Chi square con livello di significatività $p<0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE
Da 303 tamponi auricolari di cani ricoverati presso il canile municipale di Reggio Emilia sono stati isolati e testati per l'antibiotico-sensibilità 4 ceppi di *E. coli*, 6 ceppi di *Pseudomonas* spp. e 4 ceppi di *Proteus* spp., mentre 6 ceppi di *E. coli*, 17 ceppi di *Pseudomonas* spp. e 20 ceppi di *Proteus* spp. sono stati isolati da 83 tamponi di cani di proprietari privati. Nelle tabelle 1, 2 e 3 sono presentati i dati percentuali di sensibilità dei ceppi isolati a 9 diversi antibiotici, di cui sono indicate le concentrazioni per dischetto.

Tabella 1 - Percentuali di sensibilità degli isolati di E. coli a vari antibiotici (Dom.: cani di proprietà; Can: cani di canile; %S: percentuale sensibili; %R: percentuale resistenti; AMC: amoxicillina e acido clavulanico; SXT: trimethoprim e sulfonamidi)

		E. coli			
		Dom.		**Can.**	
	µg	**%S**	**%R**	**%S**	**%R**
Aminosidina	60	88	13	100	0
AMC	20+10	63	38	75	25
Ceftiofur	30	88	13	75	25
Enrofloxacin	5	75	25	75	25
Gentamicina	10	100	0	100	0
Marbofloxacin	5	63	38	75	25
Neomicina	30	25	75	50	50
Tetraciclina	30	38	63	75	25
SXT	1,25+23,75	88	13	100	0

Tabella 2 - Percentuali di sensibilità degli isolati di

Proteus spp. a vari antibiotici (Dom.: cani di proprietà; Can: cani di canile; %S: percentuale sensibili; %R: percentuale resistenti; AMC: amoxicillina e acido clavulanico; SXT: trimethoprim e sulfonamidi)

		***Proteus* spp.**			
		Dom.		**Can.**	
	µg	**%S**	**%R**	**%S**	**%R**
Aminosidina	60	65	35	50	50
AMC	20+10	60	40	75	25
Ceftiofur	30	85	15	75	25
Enrofloxacin	5	50	50	75	25
Gentamicina	10	90	10	100	0
Marbofloxacin	5	80	20	75	25
Neomicina	30	30	70	75	25
Tetraciclina	30	0	100	0	100
SXT	1,25+23,75	50	50	75	25

*Tabella 3 - Percentuali di sensibilità degli isolati di Pseudomonas spp. a vari antibiotici (Dom.: cani di proprietà; Can: cani di canile; %S: percentuale sensibili; %R: percentuale resistenti; AMC: amoxicillina e acido clavulanico; SXT: trimethoprim e sulfonamidi) (*p<0.05)*

		***Pseudomonas* spp.**			
		Dom.		**Can.**	
	µg	**%S**	**%R**	**%S**	**%R**
Aminosidina*	60	6	94	50	50
AMC	20+10	0	100	0	100
Ceftiofur	30	0	100	0	100
Enrofloxacin*	5	6	94	100	0
Gentamicina	10	71	29	83	17
Marbofloxacin*	5	53	47	100	0
Neomicina	30	0	100	0	100
Tetraciclina	30	0	100	0	100
SXT	1,25+23,75	0	100	0	100

Nei tamponi di cani di proprietà *E. coli* ha rappresentato l'8% dei batteri isolati, *Pseudomonas* spp. il 22,6% e *Proteus* spp. il 26,6%. I rimanenti isolati erano rappresentati da streptococchi, stafilocchi coagulasi positivi e coagulasi negativi. Oltre alla componente batterica, numerosi sono stati poi i tamponi positivi per il lievito *Malassezia pachydermatis*. Nei cani di proprietà i tamponi sono stati eseguiti su animali affetti da otite clinicamente manifesta e la prevalenza di germi Gram-negativi riscontrata è paragonabile a quella riportata da altri Autori (8). Per contro, i tamponi appartenenti ai cani ricoverati in canile hanno permesso l'isolamento di un 6% di *Pseudomonas* spp. sul totale dei ceppi batterici, mentre *E. coli* e *Proteus* spp. hanno ciascuno rappresentato il 4% degli isolati. Le prevalenze di germi Gram-negativi risultano sensibilmente più basse in questi animali in quanto il campione di partenza derivava da uno *screening* effettuato in canile sia su cani affetti da otite sia su cani clinicamente sani.

Come riassunto in tabella 1, gli antibiotici maggiormente efficaci verso tutti i ceppi di *E. coli* sono stati aminosidina, ceftiofur, enrofloxacin, gentamicina e trimethoprim-sulfonamidi. Pur senza differenze statisticamente significative, i ceppi isolati da cani di canile si sono rivelati mediamente più sensibili a tutti gli antimicrobici testati.

Per quanto riguarda i ceppi di *Proteus* spp., ceftiofur, gentamicina e marbofloxacin sono risultati in generale gli antimicrobici più efficaci (tab. 2); sensibilità sensibilmente maggiori si sono osservate nei ceppi di cani di canile a enrofloxacin, neomicina e trimethoprim-sulfonamidi.

Tutti gli isolati appartenenti al genere *Pseudomonas* sono risultati non sensibili ad amoxicillina-acido clavulanico, ceftiofur, neomicina, tetraciclina e trimethoprim-sulfonamidi, mentre i ceppi isolati da cani di canile sono risultati significativamente più sensibili a aminosidina, enrofloxacin e marbofloxacin rispetto ai ceppi isolati da cani di proprietà ($p<0,05$) (tab. 3). L'antibiotico in assoluto più efficace verso tutti i batteri Gram-negativi isolati è risultato essere la gentamicina, in accordo con i dati riportati in bibliografia (4, 9). Alla totale resistenza ad amoxicillina-acido clavulanico dei ceppi di *Pseudomonas* spp. isolati nel presente lavoro si affiancano segnalazioni di persistente suscettibilità a tale antibiotico da parte batteri isolati da vari Autori (4, 9). Tra i chinolonici, il marbofloxacin è risultato sensibilmente più efficace dell'enrofloxacin verso *Pseudomonas*, come anche altrove riportato (9), verosimilmente per l'estensivo utilizzo dell'enrofloxacin per trattamenti locali e sistemici nel cane. Per contro, altri Autori riportano sensibilità ancora notevoli di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* all'enrofloxacin (8), così come qui sperimentato nei ceppi isolati da cani di canile. La multi-resistenza dei batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* si pone come reperto allarmante ed in crescente aumento (3): tale fenomeno enfatizza l'importanza dei test di sensibilità agli antibiotici per stabilire il corretto protocollo terapeutico. Infatti, l'utilizzo empirico, basato sull'aspettativa del patogeno più frequentemente implicato nella patologia, così come l'abuso di farmaci antimicrobici ad ampio spettro, possono determinare una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche degli animali da compagnia, portando allo sviluppo ed alla diffusione di germi resistenti. La maggiore sensibilità riscontrata nei ceppi di *Pseudomonas* spp. isolati da cani ricoverati presso il canile può dipendere sicuramente dal minor numero di trattamenti terapeutici cui questi animali sono sottoposti rispetto a quelli di proprietà, rendendo evidente l'effetto di ripetuti o prolungati trattamenti sull'efficacia di un farmaco antimicrobico.

Un corretto utilizzo degli antimicrobici e la conoscenza dei fenomeni di antibiotico-resistenza nei batteri più frequentemente isolati da animali da compagnia sono pertanto auspicabili, così come eventuali linee guida da seguire durante l'impostazione di protocolli terapeutici.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. European Food Safety Authority (EFSA) (2009a) The community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2007. The EFSA J 223, 1-215

2. European Food Safety Authority (EFSA) (2009b) Assessment of the Public Health Significance of Meticillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Animals and Foods. The EFSA J 993, 1-73.

3. Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D.H. (2004) Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 54, 321-332.

4. Lyskova P, Vydrzalova M., Mazurova J. (2007) Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. J Vet Med A 54, 559-563.

5. Martin Barrasa J.L., Lupiola Gomez P., Gonzalez Lama Z., Tejedor Junco M.T. (2000) Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. J Vet Med B 47, 191-196.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. Eighth edition. NCCLS document M2-A8. NCCLS , Wayne, PA, USA.

7. Normand E.H., Gibson N.R., Reid S.W.J., Carmichael S., Taylor D.J. (2000) Antimicrobial-resistance in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. Prev Vet Med 46, 267-278.

8. Pedersen K., Pedersen K., Jensen H., Finster K., Jensen V.F., Heuer O.E. (2007) Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. J Antimicrob Chemother 60, 775-781.

TIPIZZAZIONE GENOTIPICA MEDIANTE PFGE DI CEPPI DI *SALMONELLA* NAPOLI ISOLATI NELLA REGIONE MARCHE

Staffolani M.[1], Medici L.[1], Luzzi I.[2], Dionisi A.M.[2], Reggiani M.C.[3]., Fisichella S.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Italy; [2] Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy; [3]ARPAM – Dipartimento Provinciale di Pesaro

Key words: *Salmonella*, PFGE

SUMMARY

In this study strains of *Salmonella* Napoli of human, food and environmental origin collected from Marche region during 2002-2008 have been characterized to value the occurrence of PFGE profiles in this area.

INTRODUZIONE

Le zoonosi a trasmissione alimentare costituiscono attualmente uno dei principali problemi di sanità pubblica.

L'agente zoonotico responsabile della maggior parte delle tossinfezioni alimentari in Europa è ancora oggi rappresentato dalla *Salmonella* (1) e i due sierotipi maggiormente isolati in Italia ed Europa nell'uomo sono Enteritidis e Typhimurium (2).

Salmonella Napoli rappresenta un sierotipo piuttosto raro in Italia. Tuttavia dal 2002 il sistema Enter-Net ha registrato un aumento di questo sierotipo in casi di infezione e da fonti ambientali, mentre sono rimasti rari gli isolamenti da fonti animali o alimentari (3). In particolare, gli isolamenti sono risultati più frequenti nella stagione estiva e in bambini di età inferiore ai 5 anni in cui il sierotipo risultava particolarmente aggressivo ed è stata dimostrata un'associazione con attività in ambienti rurali a contatto con gli animali e bagni in acque di lago (4).

Scopo del lavoro è stato quello di mettere in evidenza eventuali relazioni epidemiologiche tra i ceppi di S. Napoli isolati nella regione Marche attraverso la tipizzazione molecolare (http://www.pulsenet-europe.org/).

MATERIALI E METODI

Nella regione Marche dal 2003 al 2008 sono stati raccolti 12 ceppi di S. Napoli di origine umana, 1 ceppo di origine alimentare e 28 di origine ambientale nell'ambito delle reti nazionali Enter-Net ed Enter-Vet. Questi ultimi sono stati tutti isolati dalle acque superficiali e sotterranee legate ai processi di potabilizzazione della provincia di Pesaro-Urbino.

Tutti i ceppi sono stati inviati dalle strutture periferiche (laboratori di microbiologia ospedalieri e laboratorio del Servizio Acque del Dipartimento Provinciale ARPAM di Pesaro) al Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche, Sezione di Macerata) dove sono stati conservati in Microbank™ (Pro-Lab, Weston, Florida) a -20°C. La sierotipizzazione è stata eseguita secondo lo schema di White- Kauffman-Le Minor (5) mediante l'uso di sieri commerciali (Statens Serum Institut-Biogenetics, Danimarca). E' stato anche eseguito il test di sensibilità agli antibiotici con il metodo di diffusione in agar (6). Ogni ceppo è stato saggiato rispetto ai seguenti antibiotici: Ampicillina (A) 10 µg, Cloramfenicolo (C) 30 µg, Streptomicina (S) 10 µg, Sulfonamidi (Su) 300 µg, Tetraciclina (T) 30 µg, Acido nalidixico (Nal) 30 µg, Cefotaxime (Ctx) 30 µg, Ciprofloxacina (Cip) 5 µg, Gentamicina (Gm) 10 µg, Kanamicina (Kan) 30 µg, Amoxicillina-acido clavulanico (Amc) 30 µg, Trimethoprim-Sulfametossazolo (Sxt) 1,25/23,75, Cefalotina (Kf) 30 µg e Ceftazidime (CAZ) 30 µg; i ceppi di origine non umana sono stati saggiati in aggiunta anche nei confronti dei seguenti antibiotici: Colistina (Cl) 10 µg ed Enrofloxacina (Enr) 5 µg. La tipizzazione molecolare è stata eseguita mediante Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE) in accordo con il protocollo standardizzato Pulse-Net (7) (http://www.pulsenet-europe.org/). La digestione è stata effettuata con l'enzima di restrizione XbaI (Fermentas Life Science) e il ceppo di *Salmonella enterica* sierotipo Braenderup H9812 è stato usato come marcatore di peso molecolare (8). Le corse elettroforetiche sono state eseguite utilizzando l'apparecchio a campi pulsati Chef Mapper (Bio-Rad).

La cluster analysis è stata eseguita con il software BioNumerics (v. 4.61, Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgio). I valori di similarità sono stati calcolati con il coefficiente di Dice mentre l'algoritmo UPMGA (unweighted pair group method with arithmetic means), con 1.00% di tolleranza e 1.00% di ottimizzazione, è stato impiegato per ottenere il dendrogramma. I profili di DNA che differivano per una o più bande sono stati considerati profili distinti tuttavia ceppi con un coefficiente di similarità >90% sono stati considerati strettamente correlati dal punto di vista genetico.

RISULTATI e DISCUSSIONE

Dei 41 ceppi analizzati, 38 sono risultati sensibili agli antibiotici testati, 1 è risultato resistente alla S, 1 ha presentato profilo di resistenza ACSu+Sxt e 1 ha presentato il profilo ASSuT.

Trentasei ceppi sono risultati tipizzabili mediante PFGE. Dall'analisi dei profili di restrizione risulta che i ceppi di *S*. Napoli circolanti nella Regione Marche sono raggruppabili in 2 cluster principali, A e B, aventi omologia superiore al 90% (Fig 1). Il cluster A comprende 6 ceppi di cui 1 umano (n° 59467) che presenta un'omologia superiore al 97% con 1 ceppo di origine ambientale.

Il cluster B è il più rappresentato, comprendendo 17 ceppi isolati dalle acque superficiali e sotterranee di potabilizzazione della provincia di Pesaro-Urbino.

Un ceppo di origine umana, n° 53145, presenta un' omologia del 100% con un ceppo di origine ambientale (fiume Metauro n° 30476/07) (Fig 1). Malgrado questa omologia non sono disponibili informazioni utili a correlare epidemiologicamente i due ceppi, quello umano isolato nel 2004 e quello ambientale nel 2007. E' tuttavia interessante notare che il fiume sfocia a pochi Km da Fano dove il paziente aveva la residenza.

L'unico campione di origine alimentare è stato isolato da un campione di ciauscolo, un salume tipico marchigiano poco stagionato, prelevato nel 2007 nell'ambito di un piano di autocontrollo HACCP di un laboratorio artigianale della provincia di Macerata. Sebbene il ceppo isolato da alimento presenti un'omologia genetica del 97% con 1 ceppo di origine umana (n°64999), non risulta evidente una loro relazione epidemiologica dal momento che sia il luogo che la data di isolamento sono diversi.

Per quanto riguarda i ceppi di origine umana questi non sono epidemiologicamente correlati e le informazioni disponibili non riportano il coinvolgimento di alimenti o un'associazione con attività in ambienti rurali. In relazione al mese di prelievo e all'età dei pazienti si nota una discreta variabilità, a differenza di quanto notato in altre regioni. (4).

CONCLUSIONI

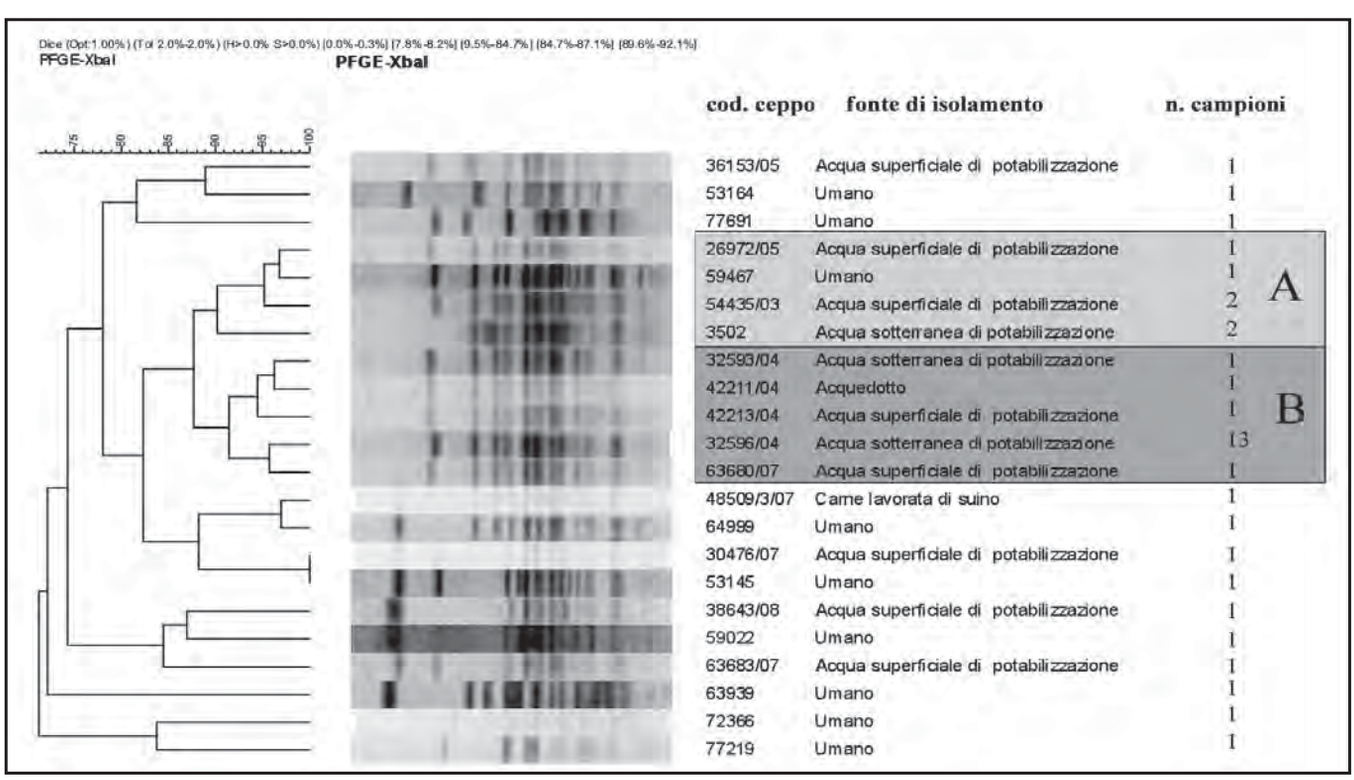
Dalla letteratura emerge che molte epidemie di salmonellosi causate da fonti idriche contaminate hanno coinvolto intere

regioni e ampi territori.
La natura ubiquitaria di *Salmonella* suggerisce che la trasmissione nell'ambiente acquatico è altamente probabile. In particolare, le precipitazioni e le alluvioni possono favorire la mobilizzazione dei batteri dall'ambiente rurale e urbano così come dagli impianti di depurazione lungo i fiumi e trasportarli nell'ambiente marino. I fattori ambientali che influenzano la presenza di *Salmonella* nelle acque superficiali non sono ancora ben conosciuti, tuttavia studiare e capire il ruolo di variabili come la temperatura e le precipitazioni sulle variazioni di concentrazione di *Salmonella* nelle acque destinate alla potabilizzazione o ad uso ricreativo, risulta fondamentale per predire e, in ultima analisi, prevenire la diffusione di questi batteri attraverso le acque. A tal proposito alcuni autori recentemente hanno trovato una stretta correlazione tra il livello di precipitazioni e la concentrazione di *Salmonella* nelle acque fluviali soprattutto se nelle vicinanze di allevamenti e campi agricoli (9).
Da questo studio preliminare emerge che la diffusione di *Salmonella* Napoli nella Regione Marche risulta alquanto peculiare, in quanto nel territorio circolano alcuni cloni ad elevata omologia che perdurano nel tempo e che si possono riscontrare negli alimenti, nell' uomo e nei corsi fluviali della provincia di Pesaro-Urbino.
Nello studio presentato, la maggioranza dei campioni positivi è stata isolata dal fiume Metauro in quanto maggiormente utilizzato e monitorato per le captazioni di acque superficiali destinate alla potabilizzazione ai sensi dell'All. 2 Sez. A del D.L. 152/2006. Nella provincia di Pesaro sono attivi 11 punti di captazione di cui 8 sull'asta fluviale del fiume Metauro; in generale, nei fiumi della provincia di Pesaro-Urbino l'impatto antropico risulta preponderante rispetto all'impatto agro-zootecnico e industriale. Sarebbe comunque opportuno approfondire lo studio tramite dati di prevalenza di *Salmonella* Napoli relativi agli allevamenti che si trovano nella valle del Metauro, dato inoltre che la regione Marche presenta un territorio ad elevato rischio idrogeologico e che fenomeni come esondazioni e frane risultano sempre più frequenti.

BIBLIOGRAFIA

(1) Press Release EURO/16/03 Copenhagen, Rome, Berlin, 16 December 2003
(2) European Food Safety Autority,2007;http://www.ecdc.europa.eu/pdf/ECDC_epi_report_2007.pdf
(3) Gill ON et al, 1983, Outbreak of *Salmonella* Napoli infection caused by contaminated chocolate bars, Lancet mar 12;1 (8324): 574-7
(4) ISSN 0393-5620 ISTISAN Congressi 05/C12 pag 34 e 42.
(5) Grimont P.A.D., F. X. Weill. 2007. Antigenic formulae for the *Salmonella* serovars, 9th Ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France.
(6) CLSI (ex NCCLS), 2002. M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. Available from: www.clsi.org; CLSI (ex NCCLS), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests , Document M2-A7 Approved Standard 7th edition, Wayne, PA, 2000
(7) Peters, T. M., C. Maguire, E. J. Threlfall, I. S. Fisher, N. Gill, and A. J. Gatto. 2003. The Salm-gene project-a European collaboration for DNA fingerprinting. Euro. Surveill 8:46-50
(8) Hunter, S. B., P. Vauterin, M. A. Lambert-Fair, M. S. Van Duyne, K. Kubota, L. Graves, D. Wrigley, T. Barrett, and E. Ribot. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. J Clin Microbiol 43:1045-1050
(9) Bradd J et al. 2009, Distribution, Diversità, and Seasonality of waterborne *Salmonella*e in a rural watershed, Appl and Environmental Microbiology p. 1248-125

Fig 1: Cluster analysis dei profili rappresentativi di PFGE ottenuti con l'enzima XbaI dagli isolati di S. Napoli.



MONITORAGGIO IN SILURI (*Silurus glanis*) PESCATI LUNGO IL TRATTO ALESSANDRINO DEL BACINO IDROGRAFICO DEL FIUME PO: LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DA MERCURIO

Tarasco R.[1], Squadrone S.[1], Leogrande M.[1], Pellegrino M.[1], Guarise S.[2], Giorgi I.[1], Palmegiano P.[1], Pascale M.[3], Prearo M.[1], Abete M.C.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 - 10154 Torino; [2] Facoltà di Medicina Veterinaria, Via L. da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO); Studi di Torino; [3] Ittiologo, Via Martiri della Libertà, 11 – 10060 Osasco (TO).

Key words: Metalli pesanti, *Silurus glanis*, Bacino idrografico del Po

INTRODUZIONE

La presenza di mercurio nell'ambiente desta preoccupazione per le forme estremamente tossiche in cui esso può trovarsi. Il mercurio è infatti un elemento non presente naturalmente negli organismi viventi, ma la sua tossicità è nota dall'antichità, già i Romani erano a conoscenza dei suoi effetti neurotossici.

Lo ione mercurio forma un composto covalente con l'anione metile: il liquido volatile dimetilmercurio $Hg(CH_3)_2$. Il processo di formazione si svolge nei sedimenti fangosi dei fiumi e dei laghi (condizioni anaerobiche). In queste condizioni, si formano anche i composti meno volatili CH_3HgX (X= Cl, OH); il frammento CH_3Hg^+ è denominato metilmercurio. Le forme metilate sono altamente tossiche e causano disordini neurologici. Il metilmercurio renderebbe l'organismo incapace di provvedere alla disintossicazione dei metalli pesanti che si accumulerebbero così nell'organismo; inoltre anche l'attività di alcuni enzimi verrebbe seriamente compromessa e si originerebbero così gravi scompensi metabolici, oltre ad indurre atassia, insonnia, parestesie, disartria ed ipoacusia.

Il siluro europeo (*Silurus glanis*) è un pesce d'acqua dolce, appartenente alla famiglia dei *Siluridae* e all'ordine dei *Siluriformes*. Originario dell'Europa centrale e orientale, è stato introdotto nei laghetti di pesca sportiva una trentina di anni fa e successivamente liberato nei nostri fiumi quando la sua presenza si era resa ingestibile, a causa delle dimensioni e dell'appetito. Nel corso degli anni la specie si è riprodotta pressoché indisturbata arrivando a costituire, oggi, una nuova minaccia all'equilibrio, già ampiamente compromesso dall'inquinamento, dei nostri fiumi soprattutto nei bacini del Po e dell'Adige.

Il siluro è un grande predatore che può raggiungere i 4 metri di lunghezza e i 290 kg di peso. Durante il giorno vive nascosto sui fondali limacciosi dei grandi corsi d'acqua, preferibilmente dove trova una ricca vegetazione. Finché è giovane si nutre di invertebrati di fondale, ma da adulto il siluro rappresenta un vorace predatore. Oltre ad entrare in competizione alimentare con lucci e storioni, si ciba anche di pesci pregiati e pare che gli esemplari più grandi non disdegnino nutrie, rane e nidiate di uccelli acquatici. E' un predatore piuttosto rapido, ma provvisto di una pessima vista. La quantità di cibo di cui si nutre giornalmente è pari al 3% circa del suo peso corporeo. I barbigli rappresentano importanti organi di senso, che gli consentono di individuare la preda al buio e in presenza di torbidità elevata (2; 4). Indagini condotte in provincia di Rovigo hanno mostrato che in media il 27% della biomassa del fiume Po sia costituito da questa specie, che è anche la più rappresentata come numero di individui (3). Il consumo delle carni di questi pesci, spesso pescati in acque inquinate, non è privo di rischi essendo un pesce di elevate dimensioni.

La taglia ideale del siluro per uso alimentare è tra 1 e 2 chili, quando la sua carne è delicata, di color bianco madreperlaceo, senza spine e squame, facile da cucinare. E' inoltre uno dei pochi pesci che possono essere sfruttati in qualsiasi modo: intero, a filetti, a trance e che ben sopportano qualsiasi tipo di cottura: al vapore, brasato, fritto, marinato e alla griglia. Nei paesi dell'est europeo, la sua carne è considerata una prelibatezza ed è apprezzata anche nel mondo occidentale.

Per questi motivi è stata condotta una ricerca per monitorare il tenore di mercurio nella parte edibile (muscolo) di esemplari di siluro europeo pescati nel bacino idrografico del fiume Po, in provincia di Alessandria (Fiume Po, Tanaro e Bormida) negli anni 2007-2008.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 37 campioni di muscolo di siluro europeo nel 2007 e 34 campioni nel 2008 per un totale di 71 esemplari. Tutti i soggetti sono stati pescati nel bacino idrografico del fiume Po, in provincia di Alessandria (Piemonte). I campioni prelevati nel 2007 sono stati pescati nel fiume Po e nel fiume Tanaro, mentre i siluri prelevati nel 2008, sono stati pescati anche dal fiume Bormida.

La ricerca del Mercurio è stata eseguita utilizzando l'analizzatore diretto del mercurio TDA-AAS (Thermal decomposition amalgamation and Atomic absorbtion spectrophotometry) su un campione di circa 0,15 g.

Le concentrazioni di Mercurio sono state ricavate per confronto con curve di calibrazioni ottenute da soluzioni standard.

Il limiti di quantificazione (LOQ) è 0,10 mg/Kg. L'incertezza di misura del metodo è di 4,5%.

RISULTATI

Durante il 2007 nel 16% dei campioni esaminati (6 esemplari) è stato superato il limite consentito dalla normativa vigente (0,5 mg Kg^{-1}, Reg. CE n. 1881/2006). Il valore medio dei campioni non conformi è di 0,55 mg Kg^{-1}, dove il tenore più elevato riscontrato è di 0,91 mg Kg^{-1}.

Nei campioni esaminati nel 2008 il limite consentito è stato superato nel 38% dei casi (13 esemplari). Il valore medio dei campioni non conformi è di 0,77 mg Kg^{-1}, dove il valore più elevato riscontrato è di 1,43 mg Kg^{-1}. (Tabella 1).

Tabella 1 - Percentuali di positività di mercurio nel muscolo di siluri.

	2007	2008	TOTALE
Totale campioni esaminati	37	34	71
Percentuale positivi	16,2%	38,2%	26,8%
Percentuale negativi	83,8%	61,8%	73,2%
N° Campioni < LOQ	1	0	1
Valore medio campioni	0,55 ppm	0,77 ppm	---
Valore massimo	0,91 ppm	1,43 ppm	---

CONCLUSIONI

I livelli di mercurio riscontrati risultano essere particolarmente interessanti, alla luce della normativa vigente. Inoltre si può osservare come nei soggetti pescati nel 2008, si riscontri un contenuto medio relativamente superiore a quello rilevato nei siluri pescati nel 2007; per tale fenomeno, si può ipotizzare come spiegazione plausibile, la presenza di soggetti con dimensioni maggiori nel 2008 rispetto all'anno precedente; infatti nel 2007, i siluri pescati presentavano un range di taglia che variava da 1 a 5 kg, mentre nell'anno successivo, la taglia dei siluri pescati variava dai 3 ai 15 kg. Per tale motivo, il livello di contaminazione è risultato più elevato e in un numero maggiore di soggetti.

I siluri rappresentano l'apice della catena alimentare fluviale; per tale ragione i livelli di contaminazione attesi non possono essere bassi, soprattutto se l'ambiente in cui vivono risulta altamente antropizzato e/o inquinato. La scelta del tratto alessandrino del bacino del Po, in cui si immettono immissari importanti quali il Tanaro ed il Bormida che fino a qualche anno fa risultavano gravemente compromessi, ha permesso di valutare come i livelli di contaminazione da mercurio siano ancora elevati.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento CE n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 (2006). Regolamento che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 20/12/2006*: L 364/5.

2. Zerunian S. (2002). Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei pesci d'acqua dolce indigeni in Italia. *Edagricole*: 151-172.

3. Turin P., Maio G., Zanetti M., Bilò M.F., Rossi V. & Salviati S. (1999). Carta ittica delle acque dolci interne della Provincia di Rovigo.

4. Milillo G.S. (1996), Tesi di Laurea, Facoltà di Economia Ambientale dell'Università degli Studi di Pescara.

5. EPA Method 7473 (1998). Mercury in solids and solutions by thermal decomposition amalgamation and atomic absorption spectrometry.

SUMMARY

In the last years a remarkable increase in heavy metals levels in aquatic environment occurred, due mainly to industrial pollution. Mercury (Hg), discharged in water basins, is transformed by bacteria in CH3-Hg+ ion, especially harmful cause it can be easily absorbed by plants and plankton of aquatic fauna. The Wels catfish *Silurus glanis*, introduced in Italy from Easter countries, is widespread in the Po river and surrounding area. In the years 2007 and 2008 a survey was performed in order to evaluated Hg levels in fish muscles. 26,8 % of collected samples exceeded the maximum residue limit (0,5 mg Kg^{-1}, Reg. CE n. 1881/2006).

TOPI MHV-FREE DA UNA COLONIA CON INFEZIONE ENDEMICA

Torcoli G.,Gregori A., Martinelli N., Lelli D., Lombardi G.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", sede di Brescia

Keywords: MHV, mouse.

SUMMARY
Mouse hepatitis virus is one of the most common causes of disease in laboratory mice and it can interfere with research. 29 offsprings of 5 couples of breeders with anti-MHV antibodies, were selected and reared in an air cab. PCR was performed mostly on faecal and sera samples. Antibody titres in selected mice showed a decreasing profile and, resulted completely negative 10 weeks after. Eight mice, still negative after 19 weeks, have been used to create a MHV-free colony.

INTRODUZIONE
Il virus dell'epatite murina (MHV) è uno dei più diffusi patogeni dei topi da laboratorio. Il suo genoma è a RNA monocatenario. MHV è dotato di envelope ed appartiene al genere *Coronavirus.* L'escrezione virale avviene con le feci e con le secrezioni respiratorie. Le madri infette ed escretrici del virus trasmettono l'infezione alla prole non appena questi perdono la protezione fornita dall'immunità passiva. Il quadro clinico della malattia si presenta eterogeneo e dipende dal ceppo virale, dall'ospite e dalle condizioni dell'allevamento (2). Ad oggi sono stati descritti 25 ceppi classificati secondo il tropismo prevalente, in respiratori (politropici) ed enterotropici. Attualmente un unico sierotipo è stato riconosciuto. I ceppi respiratori colonizzano primariamente i polmoni, ma spesso diffondono a tutto l'organismo per via ematica, linfatica e, attraverso i neuroni, sino al sistema nervoso centrale; di solito non vi è coinvolgimento intestinale. I ceppi enterotropici, sono i più diffusi tra gli animali da laboratorio per la loro maggior efficacia di trasmissione e per la difficoltà a rilevarne i sintomi; penetrano attraverso la mucosa nasale o quella intestinale per distribuirsi nel fegato, nei linfonodi addominali e, in pochi casi, nel sistema nervoso centrale(3). La malattia si può manifestare in forma subclinica (enzootica) o in forma clinica (epizootica). La maggior parte dei soggetti elimina definitivamente il virus in 3-4 settimane. Gli anticorpi circolanti specifici sono rilevabili 14 giorni dopo l'infezione (4). L'infezione da MHV può alterare i parametri fisiologici degli animali colpiti, anche se in forma asintomatica, e inficiare l'attendibilità dei risultati delle ricerche (5).
In questo studio sono descritte le procedure seguite per ottenere, da una colonia con infezione endemica, topi liberi da MHV.

MATERIALI E METODI
Animali utilizzati e prelievo dei campioni. Cinque coppie di riproduttori di topi Swiss-3T3, sono state poste in una stanza isolata rispetto al resto dell'allevamento di tipo convenzionale ed endemico per MHV. Le 5 coppie di topi progenitori sono state testate in ELISA indiretta per rilevare la presenza di anticorpi contro MHV e le feci sono state testate ogni 72 ore con metodica PCR a partire da 5 giorni prima della data presunta di parto fino allo svezzamento della prole effettuato al sedicesimo giorno d'età. Ventinove topi dell'età di 16 giorni, scelti tra la prole delle 5 coppie di riproduttori, sono stati posti in un armadio ventilato suddividendoli in gabbie da 2 o 3 soggetti dello stesso sesso. Ogni settimana, per 19 settimane, un topo è stato sottoposto ad eutanasia per prelevare campioni di sangue per l'esame sierologico e di organi (fegato, intestino, cervello e polmoni) per la PCR. Al termine delle 19 settimane, ai 10 soggetti rimasti è stato effettuato un prelievo di sangue per il controllo sierologico. Per tutta la permanenza dei topi nell'armadio ventilato, sono stati prelevati inoltre, campioni di lettiera e di mangime.
Ambiente di stabulazione. L'armadio stabulario ventilato utilizzato in questo lavoro (Tecniplast®, serie 9ARMV) è dotato di quattro ripiani isolati l'uno rispetto all'altro, ulteriormente isolati dall'esterno mediante un flusso di aria filtrata a pressione positiva. Prima dell'inizio della prova, l'armadio è stato sottoposto a pulizia, disinfezione e fumigatura finale con vapori di formaldeide. Le condizioni microclimatiche interne sono garantite da un sistema di ventilazione con controllo della temperatura. All'interno dell'armadio i topi sono stati stabulati in gabbie di metacrilato con griglia, dotata di mangiatoia e reggibottiglia. L'armadio è stato alloggiato in ambiente non barrierato, ad accesso limitato, precedentemente sanificato e fumigato con formaldeide. Tutto il materiale necessario alla stabulazione è stato sterilizzato e ,quando possibile, è stato usato materiale monouso.
ELISA. Per la rilevazione degli anticorpi è stato allestito nei nostri laboratori un test ELISA indiretto. Come antigene è stato utilizzato il ceppo MHV-A59 (ATCC®) coltivato su linea cellulare L929 e parzialmente purificato su cuscino di saccarosio. Al fine di ridurre le reazioni aspecifiche è stato prodotto un antigene negativo utilizzando la stessa linea cellulare non infetta. Il titolo d'uso di entrambi gli antigeni è stato stabilito mediante diluizioni scalari degli stessi con sieri negativi e positivi di riferimento (Harlan®). I sieri in esame sono stati testati alla diluizione 1 a 20. Gli anticorpi legati all'antigene sono stati messi in evidenza da un anti-IgG di topo prodotto in capra e marcato con perossidasi. In ogni piastra, oltre ai sieri in esame, sono stati testati anche i sieri di controllo (Harlan®) positivi e negativi.
PCR. L'utilizzo della PCR per la ricerca del genoma di MHV ha permesso di determinare se le 5 coppie di riproduttori fossero escretrici del virus nel periodo perinatale fino allo svezzamento della prole e di rilevare un'eventuale infezione degli animali nell'armadio.
La tecnica utilizzata è stata una nested-PCR preceduta dalla retrotrascrizione così come descritto da Casebolt (1).

RISULTATI
I 10 sieri delle cinque coppie di topi riproduttori sono risultati positivi in ELISA per la presenza di anticorpi anti-MHV mentre non è stata rilevata alcuna positività alla PCR eseguita sulle feci prelevate nel periodo pre e post parto.
Tutti i campioni di organi, di lettiera e di mangime prelevati nel corso dell'intera sperimentazione, sono risultati negativi alla PCR.
Secondo quanto atteso, i valori di densità ottica in ELISA riscontrati nei sieri prelevati tra il 16° e il 70° giorno di vita sono stati inferiori a quelli riscontrati nei genitori e con andamento decrescente, sino a negativizzarsi completamente oltre le 10 settimane dalla nascita. Il siero prelevato ai 10 soggetti rimanenti, è risultato negativo per anticorpi-MHV, a dimostrazione che non vi è stata circolazione virale all'interno del gruppo isolato. Otto di questi soggetti, sono stati accoppiati e utilizzati come progenitori di una linea di topi geneticamente omogenei al nostro allevamento, ma liberi sia dal virus dell'epatite murina che dagli anticorpi ematici specifici.

Tutti i risultati degli esami sierologici sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando un kit ELISA commerciale evidenziando una piena concordanza.

DISCUSSIONE

I risultati dimostrano che, con l'applicazione di misure sanitarie molto strette ed un continuo monitoraggio dell'allevamento, è possibile ottenere una colonia MHV-free da una con infezione endemica.

Il prelievo settimanale di sangue intero ha permesso di valutare l'andamento dell'immunità umorale passiva e quella attiva; inoltre è stato possibile individuare il momento della scomparsa degli anticorpi di origine materna, avvenuto all'età di 10 settimane, permettendo poi di valutare una possibile attivazione immunitaria.

L'impiego di un costante monitoraggio sanitario mediante la ricerca diretta dell'agente sia sui materiali che sugli animali, e con l'individuazione di anticorpi specifici, consente una rapida identificazione di un eventuale contatto dei topi con MHV.

L'utilizzo di topi liberi dall'infezione da MHV è fondamentale nella sperimentazione animale in quanto si elimina la possibilità di risultati alterati dall'infezione soprattutto quando è oggetto di studio il sistema immunitario(5); inoltre l'assenza di patogeni contribuisce al miglioramento del benessere degli animali.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1) Casebolt, D.B., Qian, B., Stephensen, C.B. 1997. Detection of enterotropic Mouse Hepatitis Virus fecal excretion by Polymerase Chain Reaction. Lab. Anim. Sci. 47: 6-10.

2) Barthold, S.W., Beck, D.S., Smith, A.L. 1993. Enterotropic Coronavirus (Mouse Hepatitis Virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease. Lab. Anim. Sci. 43: 276-284.

3) Homberger, F.R., Zhang, L., Barthold, S.W. 1998. Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies. Lab. Anim. Sci. 45: 50-54.

4) Homberger F.R., Thomann P.E. 1994. Transmission of murine viruses and mycoplasma in laboratory mouse colonies with respect of to housing conditions. Laboratory animal; 28(2): 113-120.

5) Baker D.G. 1998. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effect on research. Clinical microb. rev..; 11(2): 231-66.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia per la preziosa collaborazione tecnica Micaela Ricca e Davide Arienti.

CARATTERIZZAZIONE DELL'ANTIGENE AMA1 IN CEPPI DI *BABESIA BIGEMINA* ISOLATI IN ITALIA

Torina[1] A., Agnone[1,2]A., Sireci[2] G., Mosqueda[3] J.J., Blanda[1,4] V., Albanese[4] I., La Farina[4]M., Cerrone[5] A., Cusumano[1] F., Stancanelli[1] A., Caracappa[1] S.

[1]Centro di referenza Nazionale per Anaplasma, Babesia, Rickettsia and Theileria (CRABaRT), Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri"; [2]Università di Palermo, Dipartimento di Biopatologia e Metodologie Biomediche; [3] FMVZ, UNAM, Mexico; [4]Università di Palermo, Dipartimento Biologia cellulare e dello sviluppo; [5] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Keywords: AMA-1, *B.bigemina*, Vaccine

ABSTRACT. *Babesia bigemina* is an endemic parasite in different parts of the world, including Europe and the Americas. One of the few genes characterized in this species codifies for the apical membrane antigen 1 (AMA-1), a trans-membrane antigen recently identified. We characterized the *ama-1* gene from three Italian *B. bigemina* strains. Italian sequences were compared to those of the Australian strain. The results obtained confirmed that this newly described *ama-1* gene is highly conserved among Italian and foreign strains, which has implications for vaccine development.

INTRODUZIONE

La Babesiosi è una patologia che colpisce animali, selvatici e domestici, nelle fasce tropicali e subtropicali del Pianeta. Essa è causata dai parassiti intraeritrocitari del genere *Babesia*. *Babesia bigemina* è un patogeno dei bovini, e la sua trasmissione avviene per mezzo dello specifico vettore *Rhipicephalus spp,* zecca appartenente alla famiglia Ixodidae. *B. bigemina* è una delle principali cause di perdite ingenti ed economiche nell'impresa zootecnica. Sebbene in alcuni Paesi del mondo sia in uso un ceppo attenuato del parassita come vaccino, esso può mostrare reversione verso il fenotipo wild-type, divenendo causa di focolai. Per tali ragioni, ad oggi la ricerca indirizza lo studio di *B. bigemina* nel campo della biologia molecolare, al fine di identificare e studiare molecole di superficie che inducano nel bovino uno stimolo antigenico protettivo, e che sarebbero dunque utilizzabili in un vaccino a subunità.

La messa a punto di vaccini contro la babesiosi bovina è ostacolata da un intenso polimorfismo riscontrato in alcune proteine del parassita, in particolare in quelle espresse sulla sua superficie. Le molecole potenzialmente implicate nell'invasione dell'eritrocita sono numerose, tuttavia in *B. bigemina* poche sono state caratterizzate. Una di tali molecole è l'Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1), un antigene transmembrana recentemente identificato. Si pensa che, come accade in altri Apicomplexa, esso svolga un ruolo cruciale nell'invasione degli eritrociti (9).

MATERIALI E METODI

L'antigene AMA-1 è stato evidenziato in *B. bigemina* grazie all'utilizzo delle sequenze di geni ortologhi di altri microrganismi correlati. La regione corrispondente al gene è stata rintracciata nella sequenza dell'intero genoma del parassita (disponibile presso il sito Internet del Sanger Institute www.sanger.ac.uk), analizzata per trovare i codoni di inizio e fine della traduzione e su di essa si sono disegnati primers specifici (7). Il gene è stato amplificato, clonato nel vettore Invitrogen pCR2.1 TOPO TA seguendo le istruzioni consigliate dalla casa produttrice. Il plasmide ottenuto dalle colture batteriche è stato inviato alla ditta Macrogen.Inc per il sequenziamento. Le sequenze sono state allineate utilizzando i software ClustalW2.0.10 e Bioedit. Per mezzo dei software MEGA (5) e DAMBE sono state calcolate le percentuali di similitudine tra le sequenze. Tutti i risultati si basano sulla analisi delle sequenze a coppie (Pairwise analysis) e sul metodo Maximum Composite Likelihood (MEGA 4). Per ottenere le principali caratteristiche predittive della proteina, le sequenze sono state inviate al Server Expasy Proteomic. Ciascuna sequenza aminoacidica è stata dunque analizzata per individuare la presenza di possibili peptidi segnale utilizzando il Software SignalP, la presenza di possibili eliche TM utilizzando TMHMM, possibili epitopi per le cellule B utilizzando Predicting Antigenic Peptides e possibili legami disolfuro utilizzando DiANNA 1.1 (1).

RISULTATI

La regione codificante del gene AMA-1 è stata amplificata e sequenziata a partire da tre ceppi Italiani di *B. bigemina*, due provenienti dalla provincia di Ragusa e uno dalla Provincia di Benevento. Le sequenze ottenute sono disponibili su GenBank con accession numbers GQ257738, GQ257739 e GQ257740. Il gene risulta costituito da 1788bp, e codifica per un prodotto proteico di 595 amino acidi. Il peso molecolare stimato risulta essere 65.9 KDa.

Grazie alla disponibilità dei dati provenienti dal sequenziamento del suo intero genoma, il ceppo Australiano è stato considerato come ceppo di riferimento. Le sequenze di AMA-1 dei ceppi Italiani sono dunque state confrontate con la sequenza corrispondente del ceppo Australiano. A seguito dell'analisi è emerso che le sequenze dei ceppi Italiani presentano mutazioni puntiformi a livello nucleotidico in 54 posizioni. Di queste, 36 sono mutazioni sinonime e 18 missenso. Quindici mutazioni si verificano a livello della prima base del codone, 4 della seconda e 35 della terza. L'analisi delle sostituzioni aminoacidiche nella proteina AMA-1 ha mostrato un totale di 18 sostituzioni.

Tramite il software SignalP è stato rintracciato un possibile peptide segnale di 30 aminoacidi, presente alla estremità N-terminale della proteina, il cui taglio dà origine ad una proteina matura di 565 aa. Inoltre, tramite lo studio bioinformatica delle sequenze (DiANNA), sono stati rintracciati 16 residui di Cisteina probabilmente implicati nella formazione di legami disolfuro (4).

L'analisi tramite il software TMHMM ha rivelato la presenza di un'elica TM tra gli amino acidi 513 e 531, in prossimità della estremità C terminale. Tale elica divide la porzione extracellulare della proteina (1-512) dalla corta coda intracitoplasmatica (532-595). La maggior parte delle mutazioni individuate (51 mutazioni) si verificano nella porzione extracellulare della proteina; 2 si verificano nella regione intracitoplasmatica e soltanto una mutazione sinonima giace nella regione TM. La percentuale media di identità tra i ceppi italiani e quello Australiano risulta pari a 99.984%, mentre le sequenze Italiane mostrano tra loro una percentuale di similitudine pari a 99.986%. La sequenza della proteina matura dei ceppi Italiani è stata sottoposta all'analisi tramite il software Predicting Antigenic Peptides al fine di individuare epitopi per le cellule B. Il software ha rintracciato la presenza di 19 differenti peptidi, 14 dei quali sono conservati tra i ceppi Italiani e quello Australiano. Tuttavia la posizione dei peptidi nella struttura quaternaria della proteina, la loro antigenicità e la loro efficacia nella protezione necessitano ulteriori studi.

DISCUSSIONE

AMA-1 è una antigene presente in diversi Apicomplexa. Queste proteine esibiscono caratteristiche comuni in ragione delle quali sono state incluse all'interno di una famiglia (AMA-1). Le proteine inoltre, sono accomunate dalla presenza di un peptide segnale che ne determina la localizzazione alla membrana del parassita, da un'elica TM e da ponti disolfuro che suddividono le stesse in domini funzionali (4).

L'appartenenza dell'antigene recentemente identificato alla famiglia AMA-1 è stata fortemente supportata dai risultati ottenuti tramite il software P-Fam (2).

E' stato dimostrato che tanto in *Plasmodium falciparum* (8) che in *B. bovis* (3), gli antigeni AMA-1 sono coinvolti nelle fasi di ingresso del parassita nell'eritrocita dell'ospite, e che la loro inibizione causa una sensibile riduzione della capacità invasiva del microrganismo. Inoltre in *P. falciparum* (6) studi basati su peptidi sintetici hanno dimostrato che essi sono in grado di indurre una risposta immunitaria specifica in soggetti naturalmente esposti al parassita della malaria.

Dall'analisi condotta è emerso che la proteina AMA-1 derivante da ceppi Italiani di *B. bigemina* condivide caratteristiche comuni con altri membri della famiglia: il peptide segnale, l'elica TM, e 14 dei 16 residui di cisteine coinvolti nella formazione di ponti disolfuro. Tali residui risultano altamente conservati tra gli ortologhi di *B. bovis, B. bigemina* e *P. falciparum*, avvalorando così l'ipotesi di una omologia strutturale, e dunque funzionale, tra le tre proteine. Inoltre il confronto tra le sequenze dei ceppi Italiani e quello Australiano ha mostrato un grado di identità particolarmente elevato così che a livello nucleotidico che aminoacidico, conferisceo all'antigene delle ottime potenzialità per la sua inclusione in un vaccino a subunità. Si stanno implementando ulteriori analisi riguardanti l'espressione della proteina e la sua antigenicità al fine di confermare i dati ottenuti.

RINGRAZIAMENTi

Questo studio è stato sostenuto dal progetto "Caratterizzazione molecolare di antigeni di superficie dei ceppi dei protozoi *B.bovis* e *B.bigemina* per l'individuazione di potenziali candidati per lo sviluppo di vaccini e nuovi strumenti diagnostici " IZS SI 02/07 RC finanziato dal Ministero della Salute.

Si ringrazia Franco Ferraro per il valido supporto tecnico.

BIBLIOGRAFIA

1 - Ferre F. and P. Clote, 2006. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. Nucleic Acids Res.

2 - Finn R.D., J. Tate, J. Mistry, P.C. Coggill, J.S. Sammut, H.R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S.R. Eddy, E.L. Sonnhammer and A. Bateman, 2008. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Research 36, D281-D288.

3- Gaffar F.R., A.P. Yatsuda, F.F. Franssen, E. de Vries, 2004. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. Infect Immun. 72(5) 2947-2455

4 - Hodder, A.N., P.E. Crewther, M.L.S.M. Matthew, G.E. Reidi, R.L. Moritzi, R.J. Simpsoni, and R.F. Anders, 1996. The Disulfide Bond Structure of Plasmodium Apical Membrane Antigen-1. The Journal Biological Chemistry 271, No. 46, 29446–29452.

5 - Kumar S., J. Dudley, M. Nei and K.Tamura, 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics 9 299-306.

6 - Lal A.A., M.A. Hughes, D.A. Oliveira, C. Nelson, P.B. Bloland, A.J. Oloo, W.E. Hawley, A.W. Hightower, B.L. Nahlen, V. Udhayakumar, 1996. Identification of T-cell determinants in natural immune responses to the Plasmodium falciparum apical membrane antigen (AMA-1) in an adult population exposed to malaria. Infect Immun. 64(3):1054-1059.

7 - Mosqueda J., Ramos J., Falcon A., Agnone A., Torina A., Figueroa J, Alvarez A., Bautista R., Cantò G., 2007.Identification and molecular characterization of an antigen of *Babesia bigemina* with homology to the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of Apicomplexa. VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Book of proceedings. 234.

8 - Peterson, M.G., V.M. Marshall, J.A. Smythe, P.E. Crewther, A. Lew, A. Silva, R.F. Anders, and D.J. Kemp. 1989. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. Mol. Cell. Biol. 9:3151-3154.

9 - Yokoyama N., M. Okamura, I. Igarashi, 2006. Erythrocyte invasion by Babesia parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Veterinary Parasitology 138, Issues 1-2, 31, 22-32.

GAP DIAGNOSTICO NELLO STUDIO DELLO STATO LIPIDICO DEL CANE

Ubaldi A., Fusari A.
Dipartimento di Salute Animale – Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale - Università degli Studi di Parma

Key words: dog, lipidic status, lipoproteins, diagnostic gap

SUMMARY
Clinical diagnostic practice of dislipemic status in dog and correlated pathologies, recently has increased its efficancy, also thanks to analytical methods pointed out and realisable as routinary methods. But, in this context, a situation of incompatibility has rised among analytical data obtained by different methods, so that a real diagnostic gap is generated. This note stresses this gap situation through a comparative report among four different analytical methods to dose lipoproteins fractions. The aim is to make a clarifying contribution to favour the veterinary pratictioner using laboratory data to make a diagnosys

INTRODUZIONE

L'affinamento delle prassi diagnostiche ha rilevato un numero crescente di stati dislipemici nel cane, in particolare a carico delle frazioni lipoproteiche. Di conseguenza, le pratiche cliniche necessitano di metodiche di analisi affidabili al fine di perfezionare ulteriormente lo studio delle componenti fisiopatologiche degli stati alterativi lipoproteici nella specie canina.
Una apprezzabile nota di Pasquini e collaboratori (2004) (1) riporta la situazione clinico diagnostica, evidenziando le molteplici situazioni in cui le alterazioni dello stato lipidico nel cane sono basilari per la comprensione fisiopatologia e clinica della patologia.
L'iperlipidemia può essere idiopatica e svilupparsi come difetto primario del metabolismo delle lipoproteine o essere una conseguenza di una malattia sistemica.
In alcuni casi uno stato iperlipidemico può dipendere da un errato regime alimentare, caratterizzato da una dieta sbilanciata ed eccessivamente ricca di grassi (in particolare di origine animale).
Le iperlipidemie idiopatiche nel cane comprendono l'iperlipoproteinemia dello schnauzer nano e del beagle, l'iperchilomicronemia e l'ipercolesterolemia idiomatica. Le alterazioni sono caratterizzate da una marcata ipertrigliceridemia, da una modesta ipercolesterolemia, da un aumento dei chilomicroni sierici e della frazione lipoproteica beta. (1)
Nella letteratura è segnalata una ipercolesterolemia classificata come idiopatica nelle razze dobermann e rottweiler caratterizzata dalla mancata associazione con altri disturbi del metabolismo. Le alterazioni sono caratterizzate da una ipercolesterolemia e da un aumento dei livelli ematici di lipoproteine a bassa densità (frazione beta).
Tra le principali patologie sottostanti le iperlipidemie secondarie si collocano l'ipotiroidismo, il diabete mellito, l'iperadrenocorticismo, la pancreatite e le patologie renali, soprattutto di tipo degenerativo.
Nei cani ipotiroidei è comune il riscontro di una ipercolesterolemia da leggera a marcata e si riscontra un aumento soprattutto della frazione beta. Nei soggetti affetti da diabete mellito si identifica una ipertrigliceridemia elevata ed una ipercolesteloremia modesta. L'aumento delle lipoproteine è tipico nel cane non trattato e con chetoacidosi. In alcuni casi si possono verificare un aumento dei chilomicroni e delle lipoproteine beta. (1)
I cani con iperadrenocorticismo possono mostrare, in seguito all'iperlipidemia, alterazioni delle frazioni lipoproteiche caratterizzate principalmente da un aumento di lipoproteine beta. (1)
Gli studi sui cani affetti da pancreatite con ipertrigliceridemia e/o ipercolesterolemia evidenziano un innalzamento dei chilomicroni e della frazione VLDL. (1)
Nei cani con insufficienza renale cronica, soprattutto se alimentati con diete ipoproteiche, è possibile osservare un innalzamento della frazione alfa (1)
Le osservazioni riportate evidenziano chiaramente l'importanza che può assumere l'esecuzione di un lipidogramma ogniqualvolta ci si trovi di fronte ad un'iperlipidemia, sia essa primaria o secondaria, sia come ausilio diagnostico che come test di monitoraggio in corso di terapia.
E' necessario precisare che nella pratica clinica, la separazione elettroforetica e tramite cromatografia FPLC delle lipoproteine sono esami poco conosciuti e poco richiesti. La principale spiegazione di questa situazione risiede nel fatto che pochi laboratori veterinari sono attrezzati alla loro esecuzione.
Il lipidogramma del cane mostra notevoli differenze rispetto a quello dell'uomo ed è quindi necessario possedere una conoscenza approfondita della tecnica, degli intervalli di riferimento in percentuale (%) di ogni frazione, che sono strettamente legati alla specie animale. Questa ultima osservazione, comunque, non interferisce sul presente studio che è volto a valutare le divergenze esistenti tra le differenti metodiche d'analisi disponibili al momento attuale.
In questo contesto è stata affrontata un'indagine comparativa sperimentale-bibliografica tra le diverse metodiche di analisi esistenti in letteratura ed i relativi materiali diagnostici reperibili in commercio. Si ricorda che i materiali di produzione industriale vantano un elevato livello di standardizzazione in termini di riproducibilità dei componenti e delle performance analitiche.
Il confronto tra metodiche analitiche diverse deve necessariamente basarsi su campionature e sperimentazioni omogenee. Nel caso specifico, è necessario raccogliere il materiale biologico da sottoporre ad analisi da cani appartenenti alla stessa taglia e non necessariamente alla stessa razza (2). E' stato dimostrato più volte che l'affinità nella specie canina è presente già nella taglia e non obbligatoriamente nella razza. Ciò consente di raccogliere un numero di campioni più ampio e disporre di una casistica maggiore rispetto a quella disponibile sulla base della sola razza.

MATERIALI E METODI

Le indagini sono state eseguite su campioni ematici raccolti in cani di taglia media (20-35 Kg p.v.). I soggetti sottoposti a sperimentazione appartenevano ad entrambi i sessi ed avevano età comprese tra i 3 ed i 11 anni.
I cani utilizzati vantavano valori di cole Successivamente, i campioni di plasma sono stati refrigerati a 4°C ed analizzati, entro 4 ore, con un kit del commercio basato sulla metodica della precipitazione selettiva e successiva determinazione delle frazioni tramite una metodica di tipo enzimatico-colorimetrico che ha portato ad uno sviluppo di colore misurabile a 520 nm (Longlac, Milano). (3)

Il metodo di indagine denominato elettroforetico si basa sull'ottenimento di tracciati elettroforetici delle lipoproteine che si ottengono dopo una corsa in un campo elettrico e su supporto di strisce di acetato di cellulosa. La colorazione è effettuata con il colorante red Sudan. Con l'ausilio di un densitometro, che elabora i dati, è possibile ottenere un grafico che può essere interpretato valutandone la morfologia e considerando il valore percentuale di ogni frazione. (1) (4)
Il metodo analitico basato sulla ultracentrifugazione prevede una centrifugazione ad elevato numero di giri in un ambiente acquoso a densità variabile, allo scopo di separare le frazioni lipoproteiche a seguito di un gradiente di densità. La determinazione quantitativa può essere eseguita con il metodo enzimatico-colorimetrico, che è più diffuso per la semplicità dell'attrezzatura di rivelazione richiesta. (4)
Il metodo analitico denominato FPLC si basa essenzialmente sulla separazione delle frazioni lipoproteiche, in campioni freschi di plasma eparinato, mediante l'impiego di un attrezzatura cromatografia FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography). Le frazioni separate sono state valutate mediante il tasso di colesterolo con la tecnica enzimatico-colorimetrica, come avviene anche in altre metodiche di analisi qui considerate. (5,6)

RISULTATI E DISCUSSIONE

La disamina delle performance delle quattro metodiche considerate è possibile solamente tramite un confronto diretto dei risultati sperimentali ottenuti su cani di taglia media, clinicamente sani. I risultati sono riportati nella tabella n.1 e sono espressi in percentuale, allo scopo di rendere l'elaborazione più semplice e di immediata lettura.
L'esame dei dati sperimentali evidenzia che per situazioni sperimentali simili i risultati analitici divergono come nel confronto tra il metodo della precipitazione selettiva con sviluppo enzimatico-colorimetrico ed il metodo della separazione elettroforetica. Infatti, la differenza ammonta a 12,6 punti percentuali sui valori medi di popolazione.
Questo valore va oltre l'imprecisione analitica in campo biologico e denota una sostanziale differenza di selettività tra i metodi considerati. Sul piano clinico i dati ottenuti con i due metodi possono portare ad un errore di valutazione e quindi di diagnosi clinica.
Il confronto, invece, tra il primo metodo e quello della ultracentrifugazione presenta una differenza nei valori di 1,6 punti percentuali, da considerarsi praticamente poco influente sulle successive prassi diagnostiche.
La metodica che mostra la maggiore divergenza rispetto alle altre è quella denominata FPLC. Gli scarti percentuali calcolati, riportati in tabella, evidenziano la netta disparità e l'impossibilità di qualsiasi confronto, poiché la percentuale di colesterolo-HDL dosata è talmente elevata da superare di almeno venti punti percentuali la metodica elettroforetica.
Se si assumono come base i valori di HDL rilevati con le prime tre metodiche, bisogna sottolineare che la metodica FPLC ha un potere selettivo su questa frazione lipoproteica talmente superiore alle altre da renderle inutilizzabili. Se invece si assume che la metodica FPLC opera un sovra dosaggio della frazione alfa-lipoproteica, essa è da considerarsi inattendibile.
Bailhache et al. sostengono che la metodica FPLC possiede un potere di separazione e di selezione della componente HDL reale e più aderente alla vera composizione delle lipoproteine nel cane (7). Questi Autori, infatti, citano nel loro lavoro sperimentale che nel cane una parte delle HDL ha la stessa densità delle LDL, pertanto i metodi classici non sono in grado di operare una separazione accurata, sottostimando i valori di HDL.
Questa ultima considerazione, se definitivamente dimostrata, invaliderà i metodi di analisi ora in uso. AL momento, però, i primi tre metodi descritti esprimono di una utilità diagnostica, che dovrebbe essere studiata *ex novo* per la metodica FPLC.

Tabella n.1: *valori percentuali delle frazioni lipoproteiche in cani di taglia media, ottenuti con quattro diverse metodiche di analisi*

	Metodiche analitiche	**α-liprot**	**β-liprot**
Cani taglia media	1- precipitazione-colorimetrico	61,5	38,5
	2- elettrochimico	74,1	25,9
	3 ultracentrifugazione-colororimetrico	63,1	36,9
	4- FPLC	90,3	9,7
differenze percentuali tra valori medi	Δ % 1-2	- 12,6	+ 12,6
	Δ % 1-3	- 1,6	+ 1,6
	Δ % 1-4	- 28,8	+ 28,8
	Δ % 2-3	+ 11,0	- 11,0
	Δ % 2-4	- 16, 2	+ 16,2
	Δ % 3-4	- 27,2	+ 27,2

BIBLIOGRAFIA

1) Pasquini A., Lucchetti E., Cardini G. (2004) Indicazioni interpretative del tracciato elettroforetico delle lipoproteine nella specie canina. Annali Fac. Med Vet Pisa, 147-153.
2) Pasquini A: Lucchetti E., Cardini G. (2008) Plasma lipoprotein concentrations in the dog: the effect of gender, age, breed and diet. J. Anim. Phisiol. & Anim. Nutri., 92, 718-722.
3) Fusari A., Ubaldi A., Quintavalla F., Ghillani M. (2008) Metabolic profile in adult Siberian Husky 13 th Congr. ISACP, Barcellona 03 sept- 3 oct, 74-75.
4) Downs L.G. et al. (1997), Crispin S.M., LeGrande-Defretin V., Pérez-Camargo G., McCappin T., Bolton C.H. The influence of lifestyle and diet on the lipoprotein profile of Border Collies Research in Veterinary Science, 63, 35-42.
5) Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H. (1955) The distribution of chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Investig., 34, 1345-1353.
6) Kieft KA., Bocan TMA., Krause BR. (1991) Rapid on-line determination of cholesterol distribution among plasma lipoproproteins after high-performance gel filtration chromatography. J. lipid Res., 32, 859-866.
7) Bailhache E., Nguyen P., Krempf M., Siliart B., Magot T., Ouguerram K. (2003) Lipoproteins abnormalities in obese insulin-resistant dogs. Metabolism, 52, 559-564.

VALUTAZIONE DEL GRADO DI CONTAMINAZIONE IN PCB IN SILURI (*Silurus glanis*) PESCATI NEL BACINO IDROGRAFICO DEL FIUME PO (PROVINCIA DI ALESSANDRIA, ITALIA NORD-OCCIDENTALE)

Vivaldi B.[1], Ottonello G.[1], Abete M.C.[2], Pascale M.[3], Guarise S.[4], Ferrari A.[1], Marazzotta G.[1], Tarchino F.[1], Forneris G.[4], Prearo M.[2]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio Chimico Liguria, Sezione di Genova, Piazza Borgo di Porta Pila – 00000 Genova; [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; [3] Ittiologo, Via Martiri della Libertà, 11 – 10060 Osasco (TO); [4] Facoltà di Medicina Veterinaria, Via L. da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO); Studi di Torino.

Key words: Policlorobifenili, *Silurus glanis*, bacino idrografico del Po

INTRODUZIONE

Il siluro (*Silurus glanis*) presenta una morfologia particolare, con corpo allungato, robusto, cilindriforme nella porzione anteriore e compresso nella parte posteriore; la pelle è priva di scaglie, ricca di muco e la linea laterale decorre parallelamente al dorso. La testa appare massiccia, larga e appiattita dorso-ventralmente; la bocca è ampia e presenta numerosi denti conici in corrispondenza delle mascelle e del vomere. Presenta 3 paia di barbigli, un paio sulla mascella, molto mobili e lunghi e gli altri 2 sulla mandibola. La colorazione appare alquanto variabile in funzione dell'ambiente: generalmente il dorso appare scuro, mentre il ventre ed i fianchi sono più chiari (3).

Per quanto riguarda invece la zona di campionamento, la provincia di Alessandria è situata nella porzione sud-orientale del territorio piemontese. I corsi d'acqua che la percorrono sono tutti compresi nel bacino idrografico del fiume Po, poiché il confine provinciale meridionale, che si sviluppa lungo la dorsale appenninica dell'Appennino Ligure, include soltanto il versante padano della catena montuosa. Per quanto riguarda le prime segnalazioni certe sulla presenza stabile del siluro nelle acque provinciali risalgono ai campionamenti effettuati nel biennio 1989-1990 per la stesura della carta ittica regionale e riguardano il tratto terminale del fiume Tanaro ed il fiume Po. Probabilmente i soggetti campionati hanno raggiunto i siti autonomamente, risalendo il corso del Po. Nei campionamenti successivi, la distribuzione del siluro è andata aumentando a macchia d'olio, diffondendosi in tutti i corsi d'acqua con caratteristiche idonee per la sua sopravvivenza. La situazione attuale, secondo i tecnici della provincia di Alessandria, vede il siluro ancora in fase di espansione (4).

I policlorobifenili (PCB) sono inquinanti organici a carattere altamente lipofilo resistenti alla degradazione. Essi sono in grado di modulare differenziamento, metabolismo e funzionalità del tessuto adiposo bianco.

I pesci possono accumulare elevate concentrazioni di PCB ed in particolare i siluri, in quanto al vertice della catena alimentare fluviale; per tale motivo possono essere utilizzati come specie indicatrici della qualità dell'ambiente acquatico.

Scopo di questo studio preliminare è stato quello di identificare e quantificare, tramite GC-MS, i 18 congeneri di PCB in siluri pescati nel bacino idrografico del fiume Po, in provincia di Alessandria.

MATERIALI E METODI

Sono stati campionati 16 siluri pescati nel biennio 2007-2008 in provincia di Alessandria; più precisamente sono stati analizzati 10 campioni provenienti dal fiume Po, 3 campioni dal fiume Tanaro e 3 campioni dal fiume Bormida.

La fase estrattiva del campione di muscolo è stata realizzata in ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor – Dionex Corporation, Sunnyvale, CAL, USA) mediante l'impiego di una soluzione di acetone:*n*-esano (1:1) a 100°C e 102 atm su circa 0,5 g. di campione. Successivamente si è effettuata una fase di purificazione, realizzata utilizzando una combinazione di colonnine SPE e precisamente una colonnina di Silice (1 g/6 ml) e una colonnina Extrelut (3 g) a cui sono stati aggiunti 4 ml di H_2SO_4 che consentono di bruciare il grasso della matrice; l'eluente impiegato è stato l'esano (13 ml). Infine, l'analisi strumentale è stata eseguita con un gas-cromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa (DSQ-Thermo Electron, Austin, TX, USA) a ionizzazione elettronica e provvisto di analizzatore a singolo quadrupolo. Lo strumento lavora in modalità SIM (Single Ion Monitoring) e permette l'identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse. Sono stati utilizzati due standards interni, il PCB 155 per i composti più volatili e il PCB 198 per quelli meno volatili.

RISULTATI

In Tabella 1 sono descritte alcune delle caratteristiche fisiche (peso e lunghezza) dei siluri esaminati. I campioni analizzati sono compresi in un intervallo di peso che va da 0,6 a 8,5 Kg e una lunghezza compresa tra 45 e 108 cm. Vengono riportati anche i luoghi di prelievo: fiume Po, fiume Tanaro e fiume Bormida.

Tab 1. Caratteristiche dei 16 campioni di pesce siluro

Campione	Anno e Luogo di prelievo	Peso (Kg)	Lunghezza (cm)
38329/1	2007, Po	3,05	69
38404/1	2007, Po	1,95	64
41406/1	2007, Po	0,6	45
52062/1	2007, Po	4,3	89
52072/1	2007, Po	3,7	77
52083/1	2007, Po	5,6	100
54794/1	2007, Po	4,4	89
54795/1	2007, Po	2,75	78
116981/1	2007, Tanaro	6,7	91
116984/1	2007, Tanaro	5,6	94
116986/1	2007, Tanaro	4,6	92
87986/1	2008, Bormida	8,5	100
87994/1	2008, Bormida	3,4	72
88000/1	2008, Bormida	4,5	83
91550/1	2008, Po	4,2	84
91552/1	2008, Po	6,75	108

Le concentrazioni dei 18 PCB analizzati sono riportate in Tabella 2; in particolare è indicato il valore minimo, massimo e medio di ogni congenere e della somma dei 18 congeneri.

Tab 2. Concentrazione dei 18 PCB nei campioni

PCB	Valore minimo (ppb)	Valore massimo (ppb)	MEDIA (ppb)
28	0,1	81,6	8,8
52	0,8	120,1	15,9
95	1,0	96,3	9,9
101	3,3	107,6	16,8
99	2,5	93,3	14,1
110	0,2	110,2	16,5
151	0,3	141,3	12,8
149	4,9	149,8	23,7
118	3,7	115,4	17,3
146	1,8	93,5	10,6
153	13,1	329,0	53,9
105	1,1	38,2	5,9
138	6,6	270,5	39,2
187	0,7	83,0	10,4
183	0,7	42,7	7,1
177	0,2	77,1	7,3
180	1,9	106,7	18,3
170	0,2	46,9	8,4
ΣPCB	**77,0**	**2101,7**	**297,0**

L'identificazione dei singoli analiti è stata effettuata confrontando i loro tempi di ritenzione con quelli degli stessi analiti presenti in una miscela standard a 200 ppb, preparata a partire dalla miscela standard PCB-Mix 37 (Dr. Ehrenstorfer Gmbh) a concentrazione di 10 ppm in cicloesano.
La concentrazione dei 18 congeneri è stata calcolata sulla curva di calibrazione a 5 punti della miscela standard a concentrazione crescente (5-200 ppb).
La concentrazione totale di PCB trovata, varia da un valore minimo corrispondente a 77,0 ppb ad un valore massimo di 2101,7 ppb riferita alla pesata tal quale.
Il PCB 153 è risultato essere il più abbondante in tutti i campioni analizzati (valore massimo 329,0 ppb), seguito dal PCB 138 (valore massimo 270,5 ppb).
Al contrario i PCB presenti in minor quantità sono il PCB 183 e PCB 177, con un valore medio misurato rispettivamente di 7,1 ppb e 7,3 ppb.

DISCUSSIONE

Come si può osservare, risulta evidente che tutti i campioni esaminati sono contaminati da PCB, indipendentemente dalla zona di prelievo.
Osservando il valore medio riscontrato (297 ppb) si può affermare come la contaminazione da PCB sia da considerarsi un serio problema, da meglio valutare, a fronte soprattutto del nuovo interesse che la specie ittica in questione sta assumendo soprattutto per le popolazioni di origine balcanica residenti in Italia.
I livelli di contaminazione da PCB nei siluri presi in esame, confermano come tale specie rappresenti un ottimo indicatore per la valutazione del grado di inquinamento di un sistema fluviale.
Resta da ribadire come questo studio preliminare debba essere implementato per conoscere in modo più ampio la reale situazione di contaminazione da PCB.

BIBLIOGRAFIA

1. Djinovic J., Popovic A. & Jira W. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Science*, 80: 449-456.

2. Du Four V.A., Janssen C.R., Brits E. & Van Larebeke N. (2005). Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mutation Research*, 588, 2: 106-117.

3. Grimaldi E. & Manzoni P. (1990). Enciclopedia illustrate delle specie ittiche d'acqua dolce di interesse commerciale e sportive in Italia. *Istituto Geografico De Agostini, Novara*: 142 pp.

4. Scanzio T. (2009). Impatto di una specie aliena, *Silurus glanis* L., sulla catena trofica dei fiumi della provincia di Alessandria. *Elaborato finale di Ecologia; Università di Torino, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Corso di Studi in Scienze Naturali*: 1-57.

SUMMARY

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are classified as persistent organic pollutants and they show a high lipophilic character and resistance to degradation. This is the reason why they easily bioaccumulate along the food chain thus become a threat to human health and life.
The aim of this study is to detect the presence of 18 PCB congeners in *Silurus glanis* samples and to provide their quantification in the matrix object of the research project.

QUANTIFICAZIONE DI SPECIE ANIMALI IN MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE PCR REAL TIME

Zampieron C., Costa A., Comin D., Mioni R.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura Complessa1- Microbiologia Alimentare – Legnaro (PD)

Keywords: Real Time PCR; identificazione di specie; quantificazione

SUMMARY
The aim of the work is to find a reliable, fast and sensitive method for animal species identification and quantification in food. Such protocol can be used to verify the correct labeling and detect commercial fraud or to find contamination from other non-edible species. For this purpose it was optimized a real time PCR method with sybrgreen chemistry using specific primers already proposed for end-point PCR. It was created a standard curve with dilution of DNA extracted from animal muscle for each specie tested (cow, pig, turkey and chicken) that permits to quantify the percentage of a specie in unknown samples.

INTRODUZIONE
L'espressione frode alimentare si riferisce ad una pluralità di condotte illecite volte alla adulterazione, alterazione, contraffazione, sofisticazione dei prodotti alimentari. La sofisticazione si configura come un'operazione fraudolenta attraverso cui il prodotto alimentare viene sostituito in alcuni suoi ingredienti e trattato in modo da renderlo più "attraente" o simile ad altri prodotti più pregiati e, conseguentemente, più costosi. Il controllo delle specie animali contenute negli alimenti è importante al fine di tutelare i consumatori da eventuali frodi e di tutelare le loro convinzioni etico-religiose. La presenza di specie considerate 'non edibili' può essere anche indice di scarsa igiene del luogo di preparazione dell'alimento. L'identificazione di specie mediante PCR real time risulta specifica, veloce e sensibile. La sua applicazione all'identificazione e alla quantificazione di specie degli ingredienti presenti negli alimenti permette di verificare la corretta etichettatura in tempi ridotti e con un'alta affidabilità.

MATERIALI E METODI
Sono state create delle rette di calibrazione (Figure 1-4) per DNA di pollo, tacchino, bovino e suino ottenute da diluizioni seriali (100%, 50%, 10%, 5%, 3%, 1%, 0,1%) di DNA estratto da muscolo delle rispettive specie in acqua per biologia molecolare. L'estrazione del DNA è stata fatta con kit Dnesay blood & tissue kit (Qiagen). I primers utilizzati, selezionati dalla letteratura, sono riportati in Tabella 1 (1,2).
I diversi profili di amplificazione specie specifici sono stati riunificati in uno unico adattato alla Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) ed è stato aggiunto un profilo termico di dissociazione che consente di verificare la presenza di amplificati non specifici ed evitare falsi positivi. Il profilo di amplificazione adottato è: preamplificazione 50°C per 2', 95°C per 10'; 42 cicli a 94°C per 30'', 60°C per 30'' e 72°C per 40''; profilo di dissociazione: da 95°C a 60°C. La reazione è stata ottimizzata su 7500 Fast-real time PCR System (Applied Biosystems).
Sono stati testati per la quantificazione della percentuale delle specie presenti due campioni: un kebab di tacchino e bovino e una mortadella di bovino.

RISULTATI E DISCUSSIONE
Le prove effettuate per ottenere le rette di calibrazione hanno dimostrato che la tecnica consente di avere una sensibilità molto elevata poiché è possibile vedere il segnale di amplificazione fino ad uno 0,1% di DNA estratto. La pendenza e l'efficienza di reazione delle rette rientrano nei parametri di accettabilità.
L'analisi del campione di mortadella di bovino mostra la l'assenza di suino (Figura 4).
Il campione di kebab è stato testato per le specie bovino, tacchino e pollo, mostrando concentrazioni molto basse di bovino e tacchino e la presenza di pollo. Le specie bovino e tacchino sono presenti in percentuale molto inferiore rispetto alla diluizione della retta più bassa (0,1%) (Figura 2 e 3). Viceversa la percentuale della specie pollo si avvicina al 100% della retta di calibrazione (Figura 1).
Nel campione di mortadella è stata verificata la presenza della specie bovino (confermata ad un valore del 5% del controllo) (Figura 5) e l'assenza della specie suino. L'entità della quantificazione del bovino, più bassa rispetto al 100%, è dovuta probabilmente al trattamento termico subito dalla carne.
L'analisi delle curve di dissociazione e delle T_m (temperature di melting) ha consentito di identificare i segnali di amplificazione come corrispondenti agli amplificati ricercati poiché le T_m coincidono con quelle degli standard.

CONCLUSIONI
La PCR real time si è rivelata una metodica ad alta sensibilità e specificità per l'identificazione delle specie animali in alimenti anche cotti. Nei prodotti analizzati è stato possibile confermare o meno la correttezza delle indicazioni riportate in etichetta riguardo le specie presenti. La possibilità di rilevare la presenza di altre specie anche solo in tracce mediante l'analisi delle curve di amplificazione e di dissociazione rende applicabile questa tecnica per quantificare le specie presenti in un prodotto. L'applicazione della nuova tecnologia fast PCR real time consentirà di sviluppare ulteriormente la metodica mantenendo le medesime specificità e sensibilità ma riducendo notevolmente tempi e costi di analisi.

BIBLIOGRAFIA
1. Bertasi B. et al. Messa a punto di metodiche su base PCR per l'identificazione di specie in alimenti a base di carne. Industrie Alimentari-XLVI(2007) Aprile
2. Jonker K.M. et al. *Species identification in meat products using real-time PCR.* Food Additives and Contaminants 2008.

Tabella 1. Primer selezionati e utilizzati.

Primer utilizzati		
primer	**specie**	**rif.**
TCT CAC TTA CAC TAC TTG CCA CAT CTT CGT GTG TGT CCT GTT TGG ACT AG	pollo	2
CTT GAA CTA GAC CTA GCC CAA AGA TAC GCG CCG TAC TTA GAT TTC TAT CTC C	bovino	1
ATG ACC AAC ATC CGA AAA TCA C TGCCTA AGA GGG AAC CGA AG	suino	1
CCG TAA CCT CCA TGC GAA TG TAA TAT AGG CCG CGT CCA ATG T	tacchino	2

Figura 1. Retta di calibrazione riguardante la specie pollo. E' riportata la quantificazione della specie pollo relativa al campione di kebab (100%)

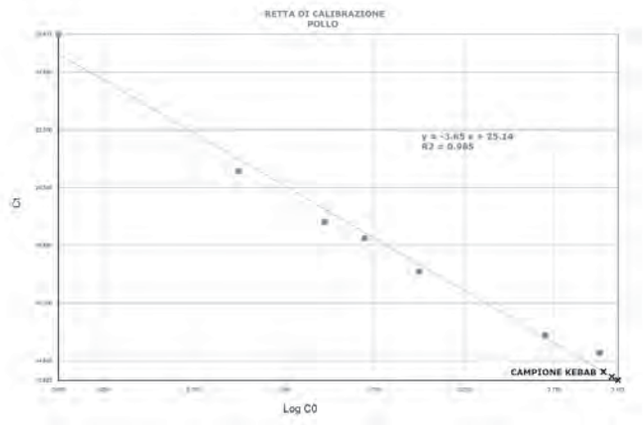


Figura 2. Retta di calibrazione riguardante la specie tacchino. E' riportata la quantificazione della specie tacchino relativa al campione di kebab (< 0.1%)

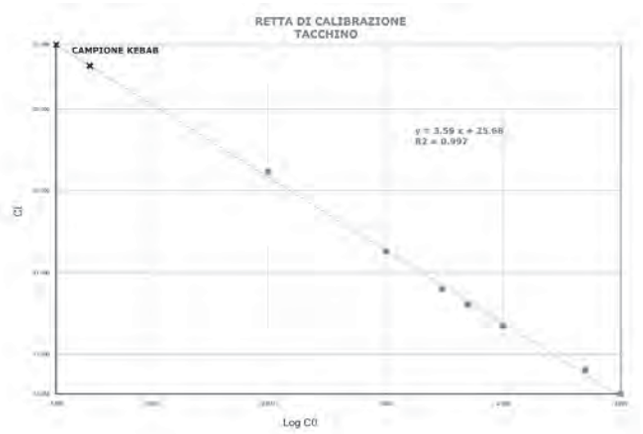


Figura 3. Retta di calibrazione riguardante la specie bovino. E' riportata la quantificazione della specie bovino relativa al campione di kebab (< 0.1%)

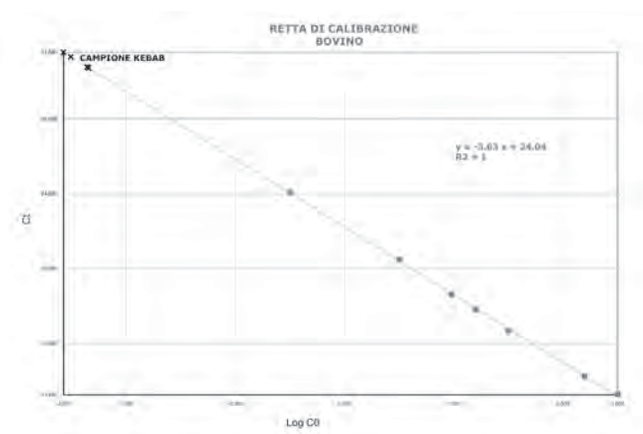


Figura 4. Retta di calibrazione riguardante la specie suino.

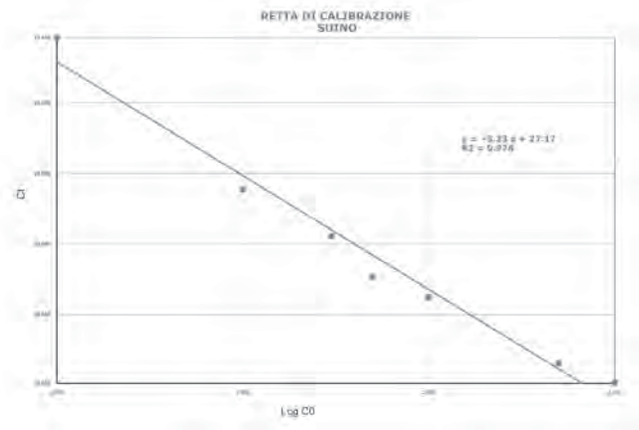
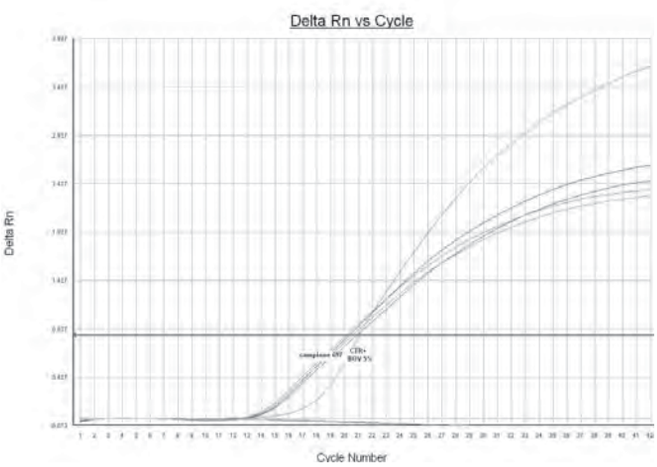


Figura 5. Segnali di amplificazione riguardanti la specie bovino per il campione di mortadella di puro bovino.



ANALISI MOLECOLARE DI CLAMIDIE ISOLATE DA INTESTINO E TAMPONI CLOACALI DI PICCIONI CATTURATI NELLE CITTA' DI MILANO E FERRARA

Vicari N.[1], Laroucau K.[2], Vorimore F.[2], Barbieri I.[3], Sachse K.[4], Hotzel H. [4], Fabbi M.[1], Labalestra I.[1], Magnino S.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", Sezione di Pavia, Centro di Referenza Nazionale per le Clamidiosi animali, [2] Unité Zoonoses Bactériennes, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Lerpaz), 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France; [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Laboratorio di Analisi Genomiche, Brescia, [4] Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany.

Key words: piccioni, tipizzazione molecolare, *Chlamydiaceae*

ABSTRACT

In order to identify and characterize six chlamydial isolates from cloacal swabs and intestines of feral pigeons, several molecular analyses were performed. DNA from the isolates was analyzed using *Chlamydiaceae*-specific real-time PCR, ArrayTube DNA microarray and species-specific molecular detection tools, i.e. real-time PCR, MLVA and complete sequences *of omp*A and 16S rDNA genes. The results obtained and the phylogenetic tree show that our six isolates do not cluster with any known chlamydial species.

INTRODUZIONE

Chlamydophila (C.) psittaci è l'agente eziologico della clamidiosi aviaria negli uccelli e della psittacosi-ornitosi nell'uomo. Si tratta di un microorganismo intracellulare obbligato diffuso in tutto il mondo in quanto veicolato da molte specie di volatili da compagnia (psittacidi e non), e di volatili domestici e selvatici. Ricerche condotte negli ultimi anni hanno evidenziato un'alta percentuale di sieropositività per *C. psittaci* tra i piccioni urbani che vivono liberamente in molte città italiane ed europee. La presenza di *C. psittaci* nei piccioni è stata confermata anche con l'isolamento del microorganismo in coltura cellulare e con metodi molecolari (1). Di seguito sono riportati i dati preliminari ottenuti mediante tipizzazione molecolare di sei ceppi di clamidia isolati da piccioni urbani campionati nelle città di Milano e di Ferrara.

MATERIALI E METODI

I ceppi di clamidia sono stati isolati in colture cellulari da tamponi cloacali (n=4) e da intestino (n=2) di piccioni urbani campionati rispettivamente a Milano e Ferrara. Il DNA è stato estratto con il kit commerciale "DNeasy blood and tissue kit" (Qiagen, Milano, Italia) e quindi analizzato con diverse metodiche molecolari:

- real-time PCR 23S che amplifica una regione del DNA codificante per l'RNA 23S riconosciuta da una sonda specifica per le specie appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae* (2);
- ArrayTube DNA microarray in grado di riconoscere il DNA di clamidia e contemporaneamente identificare le specie di *Chlamydia* e *Chlamydophila* coinvolte (3);
- real-time PCR specie–specifica per *C. psittaci* e *C. abortus* (4);
- MLVA (5), un sistema d'analisi VNTR multilocus con un alto potere discriminatorio (20 diversi patterns) in grado di riconoscere 8 diversi loci nel genoma di *C. psittaci*;
- sequenziamento completo del gene *omp*A codificante per la proteina di membrana MOMP (6) e del gene 16S rDNA codificante per l'RNA ribosomiale (7);
- analisi filogenetica delle sequenze per mezzo del software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio). Il software ha permesso il confronto tra le sequenze ottenute dal DNA dei sei isolati con un database che include le sequenze più rappresentative di tutte le specie di *Chlamydia* e *Chlamydophila* conosciute.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il DNA estratto dai sei isolati è risultato positivo soltanto in real-time PCR 23S specifica per *Chlamydiaceae*, mentre non ha dato alcuna positività né con real-time PCR specie-specifica (*C. psittaci*) né con analisi MLVA.

L'analisi ArrayTube DNA microarray (Fig.1) ha messo in evidenza la presenza di una specie non ancora classificata ma appartenente al genere *Chlamydophila.* Il DNA è stato analizzato senza esito positivo anche con una real-time PCR specifica per nuovi microorganismi appartenenti al genere *Chlamydophila* isolati di recente in allevamenti francesi di pollame (8).

Questi risultati suggeriscono l'ipotesi della presenza di una nuova specie di clamidia. Le analisi di sequenza, dei geni *ompA* (Fig.2) e 16rDNA (Fig.3) in cui è evidente che i sei isolati formano un cluster distinto dalle altre specie di clamidia, farebbero propendere proprio per questa ipotesi.

CONCLUSIONI

Le analisi molecolari effettuate mostrano che i sei isolati da piccione non sono ricompresi nei cluster delle clamidie finora note. Ulteriori studi molecolari sono in corso al fine di completare la caratterizzazione di queste clamidie, che potrebbero essere ricondotte a una nuova specie.

BIBLIOGRAFIA

1) Magnino S., Haag-Wackernagel D., Geigenfeind I., Helmecke S., DovčA., Prukner-Radovčić E., Residbegović E., Ilieski V., Laroucau K., Donati M., Martinov S., Kaleta E.F. 2009. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of dataand focus on public health implications. *Vet Microbiol* 135, 554-567.
2) Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes* 20, 60-63.
3) Borel N., Kempf E., Hotzel H., Schubert E., Torgerson P., Slickers P., Ehricht R., Tasara T., Pospischil A., Sachse K. 2008. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay—A validation study. *Mol Cell Probes* 22, 55-64.
4) Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of Chlamydophila psittaci and Chlamydophila abortus from tissue samples. *Vet. J.* 181, 145–150.
5) Laroucau K., Thierry S., Vorimore F., Blanco K., Kaleta E., Hoop R., Magnino S., Vanrompay D., Sachse K., Myers G.S.A., Bavoil P.M., Vergnaud G., Pourcel C. 2008. High resolution typing of Chlamydophila psittaci by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol* 8, 171-181.
6) Sayada *C.,* Andersen A.A., Storey C., Milon A., Eb F., Hashimcvto N., Hirai K., Elion J. and E. Denamur. 1995. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian Chlamydia psittaci isolate differentiation. 1995. *Res Microbiol* 146, 155-165.
7) Pudjiatmoko, Fukushi H., Ochiai Y., Yamaguchi T. and K. Hirai. 1997. Phylogenetic Analysis of the Genus *Chlamydia* Based on 16s rRNA Gene Sequences. *Int J Syst Bacteriol* 47, 425-431.
8) Laroucau K. et al. Submitted for publication.

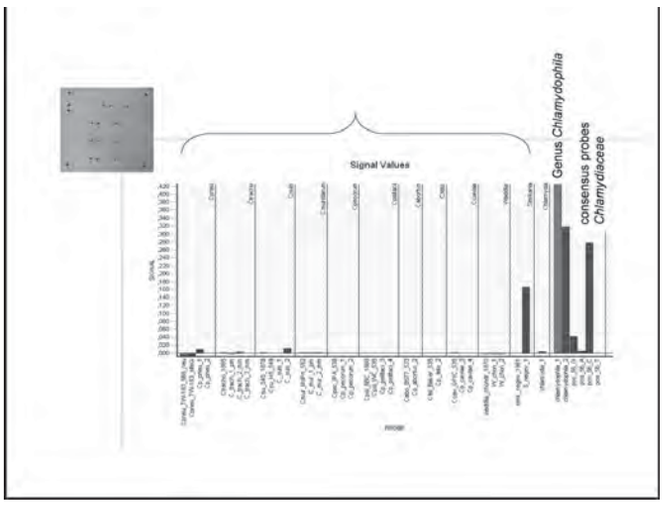


Fig.1. Analisi ArrayTube DNA microarray per l'identificazione e tipizzazione delle specie di clamidia.

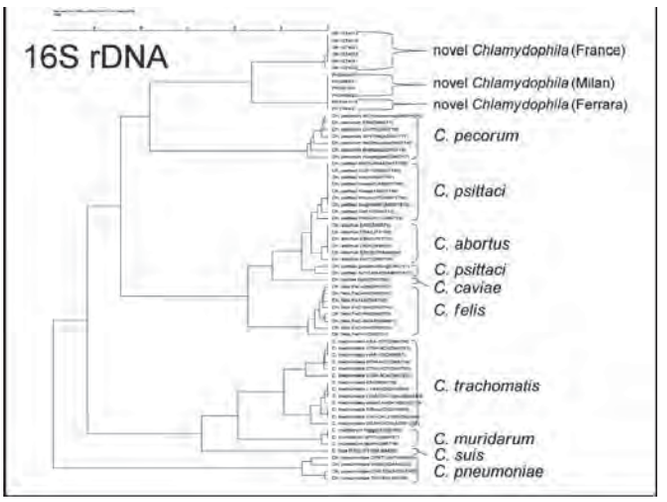


Fig. 3. Albero filogenetico ottenuto confrontando le sequenze complete del gene 16S rDNA ottenute dai sei isolati con sequenze tipo di tutte le specie conosciute di Chlamydia e Chlamydophila.

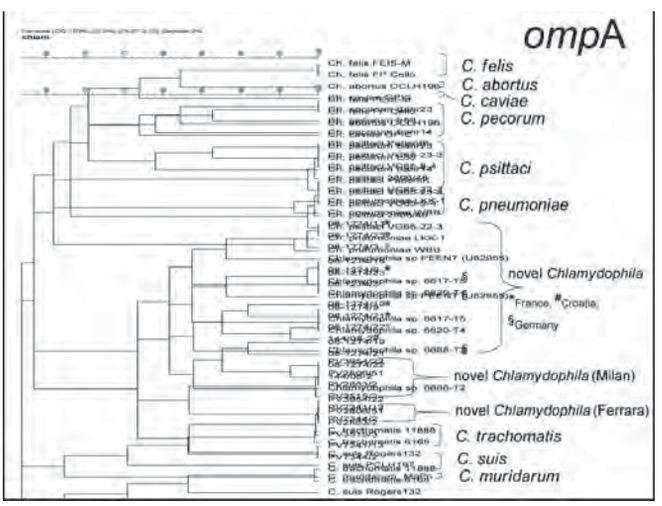


Fig. 2. Albero filogenetico ottenuto confrontando le sequenze complete del gene ompA ottenute dai sei isolati con sequenze tipo di tutte le specie conosciute di Chlamydia e Chlamydophila.

RILEVAMENTO DI *CHLAMYDIACEAE* IN AVIFAUNA SELVATICA CAMPIONATA IN PIEMONTE NEL PERIODO 2008-2009

Vicari N.[1], Mandola M.L.[2], Centorbi R.[2], Rizzo F.[2], Andreoli G.[1], Bellotti M.[1], Magnino S.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", Sezione di Pavia, Centro di Referenza Nazionale per le Clamidiosi animali, [2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.C. Virologia, Torino

Key words: *Chlamydiaceae*, real-time PCR, avifauna selvatica

ABSTRACT
The aim of this study was to detect chlamydial microorganisms in samples from wild birds (cloacal swabs and organs). One hundred and twenty samples were analysed by two different real-time PCR and two distinct conventional PCR-RFLP. Nineteen samples tested positive for *Chlamydiaceae* but negative by species-specific real-time PCR for *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus.* The percentage of positive samples detected in this survey is similar to the one reported in a recent research carried out in France. Further investigations are under way in order to characterize the involved chlamydiae.

INTRODUZIONE
La famiglia delle *Chlamydiaceae,* suddivisa nei due generi *Chlamydia* e *Chlamydophila*, comprende nove specie di notevole interesse in medicina umana e veterinaria (1). Si tratta di microorganismi intracellulari obbligati con un ciclo riproduttivo bifasico caratterizzato dalla alternanza di corpi reticolari non infettanti (fase replicativa intracellulare) e di corpi elementari infettanti (fase extracellulare). Di particolare interesse sanitario è la specie *Chlamydophila (C.) psittaci* per le sue potenzialità zoonosiche e per le sue modalità di trasmissione da animale a uomo, tramite aerosol e per contatto diretto. *C. psittaci*, agente eziologico della clamidiosi aviaria nei volatili di compagnia e nel pollame, è stata rilevata anche in volatili selvatici (2). Vengono qui riportati i dati preliminari ottenuti dalla ricerca di clamidie in uccelli selvatici campionati nella regione Piemonte e in alcune località della Liguria nel periodo 2008-2009 nell'ambito della sorveglianza influenza aviaria.

MATERIALI E METODI
Centoventi campioni (90 tamponi cloacali e 30 visceri) prelevati da uccelli selvatici (germani, cigni, piccioni e diverse specie di rapaci diurni e notturni) nell'ambito della sorveglianza per l'influenza aviaria promossa nel periodo 2008-2009, sono stati esaminati per la ricerca di clamidie. Il DNA è stato estratto con il kit commerciale "Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit" (GE Healthcare, Milano, Italia).
L'analisi di screening è stata effettuata amplificando una regione del DNA codificante per l'RNA 23S utilizzando una reazione di real-time PCR con sonda TaqMan (Applied Biosystems, Milano, Italia) come descritto in letteratura (3). Tale reazione è in grado di riconoscere tutte le specie appartenenti alla famiglia *Chlamydiaceae*. Per identificare la specie di clamidia rilevata, tutti i campioni positivi al test di screening sono stati ulteriormente esaminati utilizzando due differenti approcci:
- analisi con real-time PCR che amplifica una regione del gene *ompA* che viene ibridata da sonde specifiche per *C. psittaci* e *C. abortus* (4);
- analisi con PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) che amplificano in un caso un frammento del gene 16S rDNA (5) e nell'altro un frammento del gene *omp2* (6). Gli amplificati ottenuti sono stati digeriti rispettivamente con gli enzimi di restrizione *Mse*I e *Alu*I.
I profili di restrizione ottenuti sono stati confrontati con quelli attesi per le specie incluse nella famiglia *Chalmydiaceae*.

RISULTATI
Diciannove campioni (15,8%) hanno dato esito positivo con real-time PCR 23S rDNA per *Chlamydiaceae*. Nessuna positività è stata ottenuta con real-time PCR *ompA* specifica per *C. psittaci* e *C. abortus*. L'analisi mediante PCR-RFLP ha dato risultati contrastanti: il profilo di restrizione ottenuto dalla digestione dell'amplificato 16S rDNA con *Mse*I era riferibile a *C. abortus*, mentre il profilo di restrizione ottenuto con PCR-RFLP del gene *omp2* non poteva essere riferito ad alcuna specie di clamidia conosciuta.

Tabella 1. Specie campionate, area di campionamento e risultati ottenuti.

Specie	Area	Testati	Positivi
Germano (*Anas platyrhynchos*)	Racconigi (CN)	69	**18**
	Candia Canavese (TO)	14	0
	Verbania	3	0
	Imperia	3	0
	Romentino (NO)	2	0
	Trecate (NO)	1	0
	Stresa (VB)	1	0
	Genova	1	0
	Chiavari (GE)	1	0
Cigno (*Cygnus* sp.)	Baveno (VB)	3	**1**
	Arona (NO)	1	0
Anatra (*Anas* sp.)	Verbania	1	0
	Torino	1	0
	Genova	1	0
Anatra muta (*Cairina moschata*)	Genova	1	0
Piccione urbano (*Columba livia*)	Vercelli	10	0
	Cengio (SV)	1	0
	Cuneo	1	0
Poiana (*Buteo buteo*)	Nichelino (TO)	1	0
	Omegna (VB)	1	0
	Savona	1	0
Gheppio (*Falco tinnunculus*)	Albano Vercellese (VC)	1	0
Gufo comune (*Asio otus*)	Racconigi (CN)	1	0

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
Lo studio della presenza di clamidie nell'avifauna selvatica è stato fino a pochi anni fa finalizzato principalmente alla ricerca di *C. psittaci*, di cui è nota l'azione patogena anche per gli uccelli da compagnia e per l'uomo. Nella nostra indagine sui volatili selvatici, a differenza di quanto emerso da altre ricerche (7), non è stata rilevata la presenza di *C. psittaci*. Tuttavia, le positività riscontrate dimostrano chiaramente

la presenza di *Chlamydiaceae* nei campioni esaminati. Recenti ricerche eseguite in diversi laboratori europei (tra cui il nostro laboratorio di Pavia) hanno permesso di rilevare la presenza di altri microorganismi appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae* in volatili selvatici e di allevamento (7, 8, 9). Sono in corso studi volti all'identificazione di queste "nuove" clamidie e alla definizione della loro patogenicità nelle diverse specie animali (volatili e mammiferi) e nell'uomo. Infine si osserva che la percentuale di positività da noi rilevata è simile a quella riportata in una recente ricerca condotta in Francia dove il 10,6% di campioni sono risultati positivi (8).

Sulla base dei risultati ottenuti, non è possibile assegnare con certezza ad una specie nota le clamidie rilevate nei campioni prelevati. Analoghi risultati di positività ottenuti da indagini condotte in altri Paesi europei (9) su avifauna selvatica dimostrano che tra gli uccelli selvatici circolano microorganismi della famiglia *Chlamydiaceae* non ancora identificati.

L'identificazione dei microorganismi rilevati nei campioni oggetto di questa ricerca richiede ulteriori approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

1) Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales,* proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae,* including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 49, 415-440.

2) Kaleta E.F., Taday E.M. 2003. Avian host range of *Chlamydophila* **spp. based on isolation, antigen detection and serology.** *Avian Pathol* **32, 435-461.**

3) Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes* 20, 60-63.

4) Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of Chlamydophila psittaci and Chlamydophila abortus from tissue samples. *Vet. J* 181, 145–150.

5) Ossewaarde J.M., Meijer A. 1999. Molecular evidence for the existence of additional members of the order *Chlamydiales. Microbiology* 145, 411-417.

6) Hartley J.C., Kaye S., Stevenson S., Bennett J. and G. Ridgway. 2001. PCR Detection and Molecular Identification of *Chlamydiaceae* Species. *J Clin Microbiol* 39, 3072-3079.

7) Zweifel D., Hoop R., Sachse K., Pospischil A., Borel N. 2009. Prevalence of Chlamydophila psittaci in wild birds—potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health?. *Eur J Wildl Res* doi: 10.1007/s10344-009-0275-2

8) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoss, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal (2007)*, 13.

9) Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R., Berndt A., Schubert E., Sachse K. 2009. *Proceedings of the First European Meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic Aspects*. Murcia- Spagna 14-16 giugno 2009, p 26.

Indice degli Autori

Abete M.C.; 45, 81, 208, 220, 226, 254, 262
Accorsi A.; 58
Accurso D.; 234
Acutis P.L.; 116
Adriano D.; 91, 154
Agnetti F.; 41, 74
Agnone A.; 258
Albanese I.; 258
Albenzio M.; 240
Alberghina D.; 79
Alborali L.; 25, 52
Alio V.; 120
Aloe R.; 212
Alongi A.; 54
Amaddeo D.; 43
Amato G.; 81
Amoroso M.G.; 146
Andreoli G.; 268
Angeletti R.; 101
Antolini A.; 200
Antonello K.; 10
Antoniazzi S.; 184
Anzalone L.; 41
Appino S.; 220
Aquilini E.; 114, 142
Arculeo P.; 126
Arcuri F.; 244
Arcuri L.; 242
Arnone M.; 79
Arrigoni N.; 62, 75
Arsieni P.; 158, 160, 194, 226
Autorino G. L.; 83

Bacchi M.; 234
Balzano F.; 35
Bandino E.; 178
Bani A.; 148
Barbaro A.; 58, 85
Barbieri I.; 25, 29, 266
Barco L.; 10
Bardasi L.; 87
Barigazzi G.; 16, 112, 190
Barone A.; 83
Bartolini C.; 136
Basagni M.; 35 273
Battistacci L.; 89, 200
Bazzucchi M.; 134
Bazzucchi V.; 124
Beccaria D.; 216, 232
Beghelli D.; 89
Belletti G.L.; 62, 75
Bellotti M.; 268 273
Beltrame R.; 194
Benedetti V.; 12
Benetti C.; 206
Bergagna S.; 37, 45, 68, 91, 93, 152
Bertola G.; 216
Bertoli M.; 93
Bertolotti L.; 27
Biagetti M.; 74, 95
Bianchi C.; 108
Bianchi D.M.; 20, 37, 85, 97, 99, 154
Biasin A.; 196
Biasini G.; 122
Biosa T.; 218
Blanda V.; 258
Blasi G.; 210
Bonanno S.; 124
Bonelli P.; 70
Bonilauri P.; 52, 174, 176, 250
Boni M.; 95
Bonini P.; 43
Boniotti B.; 56, 74
Bordin P.; 118
Bortolotti L.; 101
Bosco R.; 132
Bottalico N.; 106
Bottero P.; 102 273
Bozzetta E.; 186, 188
Brajon G.; 172, 182
Breda T.; 101
Brocherel G.; 182
Brosio A.; 218, 232
Brozzi A.; 83
Brunetto T.; 97
Bruno M.; 150
Bucci E.; 106
Bugatti M.; 144
Buonincontro G.; 154
Busani L.; 162

Cagiola M.; 72, 74, 144
Cagnasso A.; 37
Callipo M.R.; 152, 198
Cammi G.; 62
Cammilleri M.C.; 126
Campagna M.C.; 104, 106
Campaniello M.; 39
Canelli E.; 29, 156
Capello K.; 101
Caporali A.; 74
Capra P.; 45
Caprioli A.; 64, 83, 162, 192
Capuano F.; 146
Caracappa S.; 54, 258
Caramelli M.; 116
Cardamone C.; 120, 126, 204
Cardente R.; 226
Careddu M.E.; 91, 102, 108
Carnevali L.; 250
Caroli D.; 20
Carrozzo A.; 242, 244
Carrozzo C.; 240
Casciari C.; 134
Cassata G.; 222
Catalano A.; 246
Cataleta A.; 110
Cattoli G.; 196
Cavallarin L.; 184
Cavallerio P.; 99
Cavallina R.; 104, 106
Cavarretta M.C.; 186,188
Centonze D.; 202
Centorbi R.; 268
Cerrone A.; 258
Ceruti R.; 29
Cesano L.; 102

Cesari L.; 20
Cesarini F.; 134
Cevidalli A.E.; 190
Checcarelli S.; 95
Chetta M.; 138
Chiapponi C.; 16, 112
Chiarenza J.; 132
Chiavacci L.; 58, 68, 85, 91, 93, 232
Chiocco D.; 110
Ciabatti I.; 43
Cicero A.; 138
Cimieri C.; 20
Ciulli S.; 156
Ciullo M.; 74
Civalleri N.; 20
Cocumelli C.; 114
Colombo A.; 166
Colorito P.; 70
Colucci C.; 170
Colussi S.; 116
Comin D.; 118, 264
Condoleo R.; 104
Conedera G.; 14
Conte F.; 146
Conterbia M.; 232
Cordioli P.; 25, 52, 56
Corrado F.; 146
Corrias F.; 172, 182
Corvonato M.; 20
Corvonato R.; 97
Costa A.; 66, 120, 264
Costarelli S.; 122, 136, 246
Crisetti E.; 110
Cristino M.; 170
Crotti S.; 124
Cucci S.; 124, 210
Curina G.; 72, 144
Cusumano F.; 258

Dacasto M.; 60
Dal Prà A.; 172, 182
Dalvit P.; 140
D'Angelo F.; 240
Dara S.; 126
Debiasi K.; 140
Decastelli L.; 20, 85, 97, 99, 128,154
Decina I.; 202
De Cosmo A.M.; 89
De Giuseppe A.; 72, 144
Dei Giudici S.; 27
De la Fuente J.; 54
Della Marta U.; 83
Dell'Oro D.; 202
DeMarco L.; 218
De Mia G.M.; 156
Di Giammarino G.; 142
Dionisi A.M.; 162, 252
Di Prisco F.; 228
Di Stasio S.; 140
Di Taranto A.; 170
Di Trani V.; 230
Di Ventura M.; 228
Di Vietro D.; 186, 188
D'Oca M.C.; 126
Doglione L.; 184, 236
Domenico Rutili.; 22
Dondo A.; 37, 45, 68, 75, 91, 93, 152, 198, 248
Dosio D.; 130
Dottori M.; 174, 176, 250
Ducato B.; 244

Eleni C.; 114
Emanuele M.C.; 132

Fabbi M.; 50, 52, 266
Fabbri M.; 20 274
Fabbrocino S.; 150
Fabris C.; 101
Faccenda L.; 122
Farina G.; 140
Farinelli M.; 95
Farneti S.; 134
Fasanella A.; 31
Feliziani F.; 134, 136
Ferrante G.; 74
Ferrantelli V.; 138, 228
Ferrante R.; 126
Ferranti P.; 150
Ferrari A.; 262
Ferrari L.; 140
Ferrari M.; 224
Ferraris M.; 164
Ferraro A.; 148
Ferro G.L.; 81
Fico R.; 182
Filippini G.; 95
Fioravanti M.L.; 158, 160
Fisichella S.; 252
Fissore E.; 102
Florio D.; 158, 160
Foni E.; 16, 47, 112
Fontana M.C.; 87, 176
Fontana R.; 25, 56
Formato G.; 142
Fornasiero M.; 116
Forneris G.; 158, 262
Forti K.; 72, 144
Fossati L.; 99
Fraccalvieri R.; 18
Fragassi S.; 97, 116
Franchini R.; 232
Frankel G.; 9
Fraticelli R.; 136
Fresi S.; 70
Fresu S.; 35
Fulghesu L.; 37, 68, 152
Fuochi P.; 126
Fusari A.; 212, 260
Fusco C.; 43, 146, 148
Fusco G.; 148

Gaffuri A.; 228
Gagliazzo L.; 14
Galante D.; 31
Galletti E.; 176
Galletti G.; 87

Gallina S.; 20, 37, 85, 97, 99, 154
Gallo P.; 150
Galuppo L.; 138
Garbarino C.; 62, 112
Garofolo G.; 31, 240
Garrone A.; 68, 152
Gatto F.; 43
Gattuso A.; 124, 210
Gavaudan S.; 228
Gelmetti D.; 52, 174
Gelmini L.; 234
Gemmato A.; 154
Gennero M.S.; 184, 236
Gherpelli Y.; 250
Ghia C.A.; 154
Ghiotti M.P.; 128
Ghiso L.; 37
Giacomelli A.; 142
Giammarioli M.; 156
Gianfelici P.; 136
Gianfranceschi M.V.; 124, 210
Gibelli L.R.; 174
Gili M.; 130, 206, 208
Giommi E.; 87
Giorgi I.; 158, 160, 194, 254
Giosuè C.; 242, 244
Giuffrida S.A.; 126
Gobbi E.; 218
Goria M.; 37, 58, 68, 152, 194, 198
Gorni C.; 12
Gradi M.; 74
Grattarola C.; 45, 248
Graziani C.; 162
Grazioli S.; 122
Gregori A.; 256
Grifoni G.; 83
Griglio B.; 128
Grimaldi M.; 118
Grippi F.; 120
Guadagnuolo G.; 150
Guarducci M.; 168
Guarino A.; 148
Guarise S.; 158, 254, 262
Guerrero L.; 244
Guida I.; 204
Guidetti C.; 164, 228
Gusmara C.; 166
Guzzo S.;168

Hofmann M.; 56
Hotzel H.; 266

Iammarino M.; 39, 170
Ianniello M.; 228
Imamovic L.; 64
Ingravalle F.; 186, 188
Invernizzi F.; 166
Iovane G.; 146, 148
Ippolito C.; 93
Iscaro C.; 134

Juganaru M.; 27

Labalestra I.; 266
La Barbera G.; 54
Lacerenza D.; 198
La Farina M.; 258
La Giglia M.; 132, 244
Lai J.; 152, 198
Lanciotti M.; 210
Laroucau K.; 266
La Salandra G.; 110
Latini M.; 41
Latorre L.; 18, 110
Laurenti M.; 214
Lavazza A.; 29, 56
Lelli D.; 25, 56, 256
Leogrande M.; 254
Leoni F.; 230
Leori S.G.; 178, 180
Lestingi C.; 41
Leto A.; 182
Lettini A.; 10
Liuni F.F.; 154
Lo Biundo G.; 242, 244
Lo Magro S.; 39
Lombardi G.; 33, 56, 256
Lombardo A.; 172, 182
Lo Previte D.; 186, 188
Loria A.; 81
Loria G.R.; 222, 224
Lorusso V.; 18
Losio M.N.; 85
Losito S.; 240
Lucchini R.; 140
Luini M.; 12, 154
Luppi A.; 174, 176, 250
Luzzi I.; 162, 252

Macaluso A.; 126
Macrì D.; 66, 138
Macrì G.; 238
Maglione D.; 218
Magnino S.; 266, 268
Maioli G.; 174, 176
Malavolta M.; 89
Maldera O.; 188
Mancano A.; 164
Mancin M.; 10
Mancuso I.; 242, 244
Mandola M.L.; 268
Mangili PM.; 74
Maniaci M.G.; 116
Mantoan P.; 99
Manzardo E.; 186, 188
Marafin E.; 10
Marangon S.; 101
Marazzotta G.; 262
Marcaccio S.; 72
Marchesi U.; 43
Marchi S.; 122, 246
Marchis D.; 81
Marengo S.; 116
Maresca C.; 74, 122
Mariani P.; 12
Mari M.; 182
Marini C.; 134
Mariotti C.; 122, 136

Marogna G.; 178, 180
Marongiu A.; 35
Marotta V.; 128
Marozzi S.; 104
Martelli S.; 182
Martinelli N.; 33, 56, 256
Martorana C.; 138
Marziano M.L.; 64, 192
Masini L.; 230
Masoero L.; 58, 198, 216, 218, 232
Massari L.; 128
Mastromatteo G.; 214
Mauro C.; 81
Mazza G.; 16
Mazzini C.; 234
Mazzone P.; 72, 74, 95, 144
Medici L.; 252
Medini D.; 95
Mellia E.; 184, 236
Meloni D.; 186, 188
Merenda M.; 62, 190
Merialdi G.; 87, 176, 234
Micci E.; 136
Miccolupo A.; 18
Michelacci V.; 64, 192
Migarone E.; 130, 208
Mignone W.; 116
Minardi D.; 158, 194
Mioni R.; 118, 264
Mocchegiani E.; 89
Molinar Min A.R.; 214
Monini M.; 196
Monnier M.; 58, 152, 198
Montagnoli C.; 72
Monteverde V.; 79
Morabito S.; 64, 192
Morena V.; 104
Moreno A.; 25, 56
Moriconi M.; 168
Moscati L.; 89, 200
Mosqueda J.; 258
Mosso P.; 214
Motta A.; 108
Muratore G.; 106
Muscarella M.; 39, 171
Musella C.; 128
Napoletano M.; 148
Napoli C.; 120
Nappi R.; 198
Nardelli V.; 202
Nardiello D.; 39
Nardini R.; 74
Nardoni A.; 106
Navillod F.; 164, 228
Nicholas R.A.J.; 224
Nicolussi P.; 70
Nifosì D.; 120
Nocilla L.; 186, 188
Noli A.; 14
Normanno G.; 18,110

Oliveri G.; 204
Olivo F.; 130, 206, 208
Orletti R.; 230
Orsini S.; 246
Ortenzi R.; 95
Ortolani D.B.; 52
Orusa R.; 164, 228
Ottaviani D.; 230
Ottonello G.; 262

Pacciarini M.L.; 74
Pais L.; 70
Paiusco A.; 118
Paladini I.; 172, 182
Palermo C.; 202
Palermo P.; 164, 228
Palleschi G.; 168
Palmegiano P.; 254
Palombo B.; 210
Palumbo P.; 66
Papa P.; 74, 96
Parisi A.; 18
Parlato C.; 99
Pascale M.; 158, 254, 262
Pasolli C.; 228
Pasquali P.; 72, 144
Passeri B.; 210
Paternesi B.; 72, 144
Paternò A.; 43
Pavoletti E.; 160, 194, 220, 226
Pavoni E.; 85
Peano A.; 214
Pecorelli I.; 246
Pedditzi A.; 27
Pela M.; 200
Peletto S.; 116, 216
Pellegrini C.; 156
Pellegrino M.; 254
Pengo M.; 101
Pennelli D.; 29
Percipalle M.; 138
Pezzoli L.; 128
Piacenza F.; 89
Piazza A.; 172, 182
Piccinini R.; 12, 233
Piccione G.; 79
Pierantoni M.; 16
Pilo C.; 178, 180
Pilo G.A.; 70
Pinto L.; 248
Pintore A.; 228
Piraino C.; 132
Pitti M.; 216, 218, 232
Pivetta E.; 128
Pizzo E.; 140
Ponti M.N.; 27
Pozio E.; 234
Pourquier P.; 238
Pozzo L.; 184
Prearo M.; 158, 160, 194, 220, 226, 254, 262
Profiti M.; 27
Puggioni G.; 27
Puleio R.; 222, 224

Quarchioni C.; 43

Radaelli M.C.; 58
Radium P.; 97
Ragona G.; 172, 182

Rambozzi L.; 214
Ramini M.; 234
Reale S.; 66, 67
Reggiani M.C.; 252
Reina R.; 27
Re M.; 16
Re R.; 70
Rezza G.; 49
Ribero A.; 108
Ricchi M.; 62
Ricci A.; 10
Riccò M.; 3
Righetti M.; 194, 226
Riina M.V.; 116
Riva A.; 218
Rizzo F.; 268
Robetto S.; 228
Rocchegiani E.; 230
Rosati S.; 27, 153
Rosignoli L.; 74
Rossi E.; 156
Rossi F.; 37, 45, 68, 91, 93, 152, 216
Rostellato D.; 101
Rotolo L.; 184
Rubinetti F.; 218, 232
Ruggeri F.M.; 196
Rugna G.; 234
Russo Alesi E. M.; 204
Rutili D.; 22

Saccares S.; 104
Sachse K.; 266
Sala M.; 114
Salamano G.; 184, 236
Sala V.; 166
Salvato L.; 238
Salvatori-Franchi F.; 246
Santacruz M.; 242
Santagada G.; 18
Sant S.; 152
Saragaglia C.; 194, 226
Saralli G.; 83
Sardisco F.; 222
Sattanino G.; 128
Savio V.; 208
Scanzio T.; 158
Scaramozzino P.; 114, 142, 228
Scarpulla M.; 238
Scasciamacchia S.; 240
Scatassa M.L.; 242, 244
Schianchi G.; 178, 180
Schiavo M.R.; 222, 224
Schiavone A.; 184, 236
Scicluna M.T.; 83
Scimeca S.; 54
Sciortino S.; 66, 204
Scoccia E.; 122
Scuota S.; 124
Sebastiani C.; 95
Sensi M.; 122, 200, 246
Serpe L.; 150
Serrecchia L; 31
Sireci G.; 258
Soncin A.R.; 248
Sozzi E.; 25, 56, 157
Spaggiari B.; 174, 176, 250
Sposito P.; 79
Squadrone S.; 220, 226, 254
Staffolani M.; 252
Stancanelli A.; 242, 244, 258
Stefanelli S.; 182
Stella P.; 206
Susini F.; 41

Taccori F.; 172
Tagariello T.; 148
Tamburello A.; 222, 224
Tarantola M.; 236
Tarasco R.; 220, 254
Tarchino F.; 262
Tardiola A.; 168
Targhetta C.; 14
Tavano R.; 146
Tavoloni T.; 41
Tellini I.; 172
Thuer B.; 56
Tinaro M.; 246
Tittarelli C.; 29
Todaro M.; 242
Todini V.; 95
Tola S.; 178
Torcoli G.; 256
Torina A.; 54, 258
Tozzoli R.; 64, 192
Travaglio S.; 58
Traversa A.; 91, 99
Trisorio S.; 116
Trocchi V.; 176
Tursi M.; 198

Ubaldi A.; 212, 260
Ultre M.; 226

Valentini S.; 196
Valenti R. M.; 204
Valnegri L.; 166
Vella A.; 120
Venditti G.; 95
Verginelli D.; 43
Vezzoli F.; 12
Vicari D.; 138
Vicari N.; 266, 268
Vicente J.; 54
Vidili A.; 178
Vitale F.; 138
Vitale M.; 132, 244
Vitale N.; 58, 68, 91,93, 232
Vitelli F.; 136
Vivaldi B.; 262
Vorimore F.; 266

Zampieron C.; 264
Zanni I.; 112
Zanoni M.; 52
Zanoni R.G.; 160
Zedda M.; 35
Zepparoni A.; 43
Zicavo A.; 124
Zizzo N.; 220
Zoppi S.; 37, 45, 68, 91, 93, 198, 216, 248
Zuccon F.; 116

Note

Note

Note

Note

Note

Note

Finito di stampare
nel mese di settembre 2009
da LITOGRAFIA LA DUCALE SRL - Parma